

INTERAÇÃO ENTRE *TRIBOLIUM CASTANEUM* (HERBST) E FUNGOS PRODUTORES DE MICOTOXINAS

Carolina Correia Hilário

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em **Engenharia
Alimentar**

Orientadores: Doutora Maria Otília de Almeida Carvalho
Professor Doutor Ricardo Boavida Ferreira

Presidente:

Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Professor Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais:

Doutora Paula Cristina da Cruz Oliveira Soromenho de Alvito, Investigadora Auxiliar do(a) Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge;

Doutora Maria Otília de Almeida Carvalho, Investigadora Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Um obrigada muito especial:

À minha orientadora, Doutora Maria Otília Carvalho, por ter aceite ser minha orientadora, pelo apoio, motivação e ajuda durante todo este trabalho.

Ao meu orientador, Professor Doutor Ricardo Boavida Ferreira, pelas dicas e entusiasmo.

À Doutora Ana Magro, pela paciência, persistência e incansável ajuda em todos os momentos da minha tese, nunca deixando de acreditar que as coisas valiam a pena.

À Doutora Sónia Duarte e à Doutora Graça Barros, por todo o acompanhamento e auxílio, mesmo fora de horas, por terem sempre uma palavra amiga e pela ajuda inigualável até ao último dia.

Aos meus amigos de laboratório, João Limão e Sara Cunha, por todos os momentos de cumplicidade, de desabafos e partilha de conhecimentos. Sem vocês, teria sido mais difícil.

À Raquel Sousa e ao Márcio, por tirarem todas as minhas dúvidas e estarem sempre disponíveis em ajudar.

À Doutora Paula Alvito e aos membros do projeto *SafeGrain*.

À Patrícia Rebelo e à Joana Mota, por terem acompanhado parte do meu trabalho sem nunca negar.

À Cátia e aos meus amigos, por todas as conversas e desabafos, pelos cafés inesperados e pelas palavras de apoio em todo este percurso.

Aos meus pais, Natércia e João, por realmente nunca terem dito um não mesmo quando existiam ambições desmedidas, pela preocupação constante e pelas conversas alongadas sobre a vida.

Ao meu irmão, João, por todas as gargalhadas e palavras sinceras e por achar sempre que eu valho mais do que penso.

RESUMO

A contaminação de cereais e derivados por insetos e fungos é uma problemática atual pois estes organismos, através não só do consumo dos cereais, mas também a partir da contaminação por substâncias excretadas por fungos e insetos, podem causar avultados prejuízos quantitativos e qualitativos durante o armazenamento dos cereais e derivados.

O *Tribolium castaneum* (Herbst) é considerado uma praga secundária de cereais e derivados armazenados. Os adultos excretam benzoquinonas, que conferem proteção contra eventuais predadores ou competidores, bem como contribuem para o controlo da densidade populacional. Os fungos de armazenamento atacam os grãos durante o armazenamento e causam danos qualitativos e quantitativos e podem produzir micotoxinas. A natureza da interação entre estes dois tipos de organismos e dos respetivos metabolitos secundários excretados por ambos (benzoquinonas e micotoxinas) é ainda uma incógnita, no entanto, a complexidade dessa interação pode revelar dados importantes para futuras estratégias de controlo destas pragas nos produtos armazenados.

Os objetivos deste trabalho foram investigar a influência da presença de insetos na microbiota das farinhas de milho, bem como na produção de micotoxinas por parte desses fungos, e analisar o efeito das benzoquinonas sobre fungos das farinhas de milho e sobre bactérias.

A avaliação da atividade fungicida e fungistática das benzoquinonas mostrou que para o *A. flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum* e *P. purpurogenum* não existiram efeitos significativos relativamente ao crescimento dos fungos. No entanto, a benzoquinona diluída em água destilada esterilizada interferiu no crescimento do fungo *Trichoderma* sp.. Os resultados mostraram também que as benzoquinonas podem ter um efeito negativo nos fungos, ao nível da morfologia das colónias. Os resultados obtidos relativamente à deteção de micotoxinas (aflatoxinas e ocratoxina A) foram inferiores aos limites de deteção (LOD) nos dois ensaios testados. No caso do efeito das benzoquinonas sobre as bactérias não ocorreu crescimento bacteriano nas amostras em contacto com as concentrações mais elevadas de benzoquinonas diluídas em água, o que sugere que estas possam ter um efeito negativo nas bactérias analisadas.

Após a análise de todos os resultados estatísticos referentes ao efeito fungicida e fungistático das benzoquinonas libertadas por *T. castaneum*, conclui-se que existem indicações que estas substâncias podem interferir no crescimento dos fungos testados, apesar de ser notória a necessidade de aprofundar o estudo desta interação.

Apesar do carácter exploratório deste trabalho, foi um passo importante no sentido de investigar e procurar respostas como o tipo de interação entre esta praga de insetos, em farinha de milho, e os fungos e bactérias.

Palavras – chave: Bactérias; Benzoquinonas; Fungos; Milho; *Tribolium castaneum*.

ABSTRACT

The contamination of cereals and derivatives by insects and fungi is a timely matter since these organisms may cause, not only quantitative but also cause qualitative losses due to consumption and contamination with substances excreted by them, causing economical losses.

Tribolium castaneum is a secondary pest of stored cereals and derivatives. The adults produce benzoquinones as defensive secretions, possibly also acting as population growth regulators. Fungi associated with stored products are also responsible for quantitative and qualitative losses and can produce mycotoxins. The relationship between *T. castaneum* and fungi, and their excreted substances (benzoquinones and mycotoxins, respectively) is not yet completely understood, although this information could reveal valuable support for stored product decision making.

The objectives of this work were to study the influence of insects on the mycobiota of corn flour and on the production of mycotoxins by fungi and to evaluate the effect of benzoquinones on fungi and bacteria.

The evaluation of the fungicidal and fungistatic activity of benzoquinones did not show significant differences in the growth of *A. flavus*, *A. niger*, *F. oxysporum*, and *P. purpurogenum*. However, benzoquinone diluted in sterile distilled water interfered with the growth of *Trichoderma* sp. The results also showed that benzoquinones may exert a negative effect on fungi, regarding fungi colony morphology.

Mycotoxins (aflatoxins and ochratoxin A) were below the limits of detection (LOD). No bacterial growth occurred in the samples in contact with the benzoquinones diluted in water, which suggests that they may have a negative effect on the tested bacterial strains.

The main conclusions of this work indicate that the benzoquinones excreted by *T. castaneum* may have a negative influence on some fungi associated with corn flour, as well as may exert a bactericidal effect. Further studies are needed, including new methodologies for assessing the fungicidal effect of benzoquinones, selection of solvents innocuous for fungi, and the use of different concentrations of benzoquinones.

Despite the exploratory nature of this work, it was an important step towards unveiling the type of interaction existing between this insect pest and: fungi in corn flour, and bacteria.

Key – words: Bacteria; Benzoquinones; Fungi; Maize; *Tribolium castaneum*

INDICE

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
SIGLAS E ABREVIATURAS	x
1.1. O MILHO.....	1
1.1.1. IMPORTÂNCIA ECONÓMICA E ALIMENTAR DO MILHO	1
1.1.2. ARMAZENAMENTO DO MILHO.....	2
1.2. INSETOS NO MILHO ARMAZENADO	3
1.2.1. PERDAS CAUSADAS POR INSETOS	3
1.2.2. <i>TRIBOLIUM CASTANEUM</i>	4
1.2.3. BENZOQUINONAS	5
1.3. FUNGOS NO MILHO ARMAZENADO	7
1.3.1. PERDAS CAUSADAS POR FUNGOS.....	7
1.3.2. FUNGOS DE CAMPO E FUNGOS DE ARMAZENAMENTO	8
1.3.3. MICOTOXINAS	10
1.4. BACTÉRIAS NO MILHO ARMAZENADO.....	12
CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	15
2.1.1. FARINHA DE MILHO	15
2.1.2. INSETOS	15
2.2. PARÂMETROS	15
2.2.1. TEOR DE HUMIDADE	15
2.2.2. ATIVIDADE DA ÁGUA (a_w)	16
2.3. ENSAIOS.....	16
2.3.1. CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA EM GRÃOS DE MILHO	17
2.3.2. CARACTERIZAÇÃO DA MICROBIOTA DA FARINHA DE MILHO.....	18
2.3.3. PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS	19
2.3.4. REDUÇÃO DE MASSA DA FARINHA CAUSADA PELO DESENVOLVIMENTO DO <i>TRIBOLIUM CASTANEUM</i>	21
2.3.5. INTERAÇÃO ENTRE ADULTOS DE <i>TRIBOLIUM CASTANEUM</i> E FUNGOS, EM FARINHA DE MILHO	21

2.4. EFEITO DAS BENZOQUINONAS SOBRE FUNGOS E BACTÉRIAS	21
2.4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA E FUNGISTÁTICA DA 1,4 – BENZOQUINONA	21
2.4.2 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BACTERICIDA DAS 1,4-BENZOQUINONAS	22
2.4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	24
3.1. CARACTERIZAÇÃO DA MICOBIOTA EM GRÃOS DE MILHO	24
3.2. CARACTERIZAÇÃO DA MICOBIOTA EM FARINHA DE MILHO	25
3.3. DETERMINAÇÃO DAS MICOTOXINAS.....	27
3.4. REDUÇÃO DE MASSA DA FARINHA DE MILHO CAUSADA PELO DESENVOLVIMENTO DO <i>TRIBOLIUM CASTANEUM</i>	28
3.5. INTERAÇÃO ENTRE O INSETO ADULTO E OS FUNGOS, EM FARINHA DE MILHO	29
3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA E FUNGISTÁTICA DA 1,4 – BENZOQUINONA....	30
3.6.1. <i>Aspergillus flavus</i>	30
3.6.2. <i>Aspergillus niger</i>	32
3.6.3. <i>Fusarium oxysporum</i>	34
3.6.4. <i>Penicillium purpurogenum</i>	36
3.6.5. <i>Trichoderma</i> sp.....	38
3.7. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BACTERICIDA DA 1,4-BENZOQUINONA	41
CAPÍTULO 4 – CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	44

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1- Principais grupos de micotoxinas, espécies de fungos produtores e género alimentício...	11
Quadro 2- Resumo dos parâmetros de validação do método cromatográfico usado na determinação de aflatoxinas totais e ocratoxina A e teores máximos legislados.	20
Quadro 3- Frequências absoluta e relativa (%) das espécies de fungos identificados nos grãos de milho em meio PDA e em papel de filtro.....	25
Quadro 4- Qualificação das espécies de fungos relativamente à sua frequência em meio PDA.....	25
Quadro 5- Qualificação das espécies de fungos relativamente à sua frequência em papel de filtro ..	25
Quadro 6- Identificação de fungos nas diferentes amostras testadas (Ensaio 1- mantiveram-se os insetos; Ensaio 2- retiraram-se os insetos após 40 dias; 20 TCT- 20 insetos; 40 TCT- 40 insetos; 60 TCT- 60 insetos). Círculo azul significa a presença da espécie de fungo em questão.	26
Quadro 7- Teores de água (%) das amostras testadas (Ensaio 1- mantiveram-se os insetos; Ensaio 2- retiraram-se os insetos após 40 dias; 20 TCT- 20 insetos; 40 TCT- 40 insetos; 60 TCT- 60 insetos). 27	

Quadro 8- Resultados da determinação das micotoxinas em farinha de milho (AFB1: Aflatoxina B1; AFB2: Aflatoxina B2; AFG1: Aflatoxina G1; AFG2: Aflatoxina G2; AFM1: Aflatoxina M1; OTA: Ocratoxina A) nos ensaios E1 (Mantiveram-se os insetos) e E2 (Retiraram-se os insetos).....	28
Quadro 9- Valores de a_w das amostras analisadas no final do ensaio	28
Quadro 10- Avaliação do crescimento radial do fungo <i>Aspergillus flavus</i> (%) durante sete dias	32
Quadro 11- Avaliação do crescimento radial (%) do fungo <i>Aspergillus niger</i> durante sete dias	34
Quadro 12- Análise estatística do <i>Fusarium oxysporum</i>	35
Quadro 13- Avaliação do crescimento radial do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> (%) durante sete dias ..	36
Quadro 14- Avaliação do crescimento radial do fungo <i>Penicillium purpurogenum</i> (%) durante sete dias	38
Quadro 15- Análise estatística do <i>Trichoderma</i> sp.	39
Quadro 16- Avaliação do crescimento radial do fungo <i>Trichoderma</i> sp. (%) durante sete dias	40
Quadro 17- Resumo dos resultados do ensaio de exposição de <i>Escherichia coli</i> a benzoquinonas e seus solventes	42
Quadro 18- Resumo dos resultados do ensaio de exposição de <i>Listeria monocytogenes</i> a benzoquinonas e seus solventes	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Larva de <i>Tribolium castaneum</i> (A) e pupa de <i>Tribolium castaneum</i> (B)	4
Figura 2- <i>Tribolium castaneum</i> adulto (A) e pupas de <i>Tribolium castaneum</i> (B).....	4
Figura 3- 1,4-benzoquinona (BQ)	6
Figura 4- Concentração de aflatoxinas ao longo do tempo em milho	12
Figura 5- Esquema resumo dos materiais e métodos.....	16
Figura 6- Cromatogramas relativos à análise de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e AFM1) e ocratoxina A (OTA) por HPLC com fluorescência em farinha de milho: A (Amostra de milho) e B (Amostra de milho contaminada com as condições do método utilizado).	20
Figura 7- Caracterização da micobiota: Caixa de Petri com meio PDA (A) e caixa de Petri com papel de filtro (B)	24
Figura 8- Caracterização da micobiota nos diferentes ensaios. Fungos presentes no ensaio 1 (mantiveram-se os insetos nas farinhas durante 52 dias) (A) e no ensaio 2 (retiraram-se os insetos ao fim de 40 dias, mantendo as farinhas sem insetos até 52 dias) (B) em meio de PDA (potato dextrose agar)	26
Figura 9- Colonização do inseto por parte de um fungo, ao terceiro dia de ensaio.....	30
Figura 10- (A) Ensaio do <i>Aspergillus flavus</i> utilizando o metanol como solvente; (B) <i>Aspergillus flavus</i> utilizando a água como solvente e (C) <i>Aspergillus flavus</i> utilizando etanol como solvente.	31
Figura 11- Comparação do crescimento do fungo <i>Aspergillus flavus</i> quando submetido aos diversos tratamentos	31
Figura 12- (A) Ensaio do <i>Aspergillus niger</i> utilizando o metanol como solvente; (B) <i>Aspergillus niger</i> utilizando a água como solvente e (C) <i>Aspergillus niger</i> utilizando etanol como solvente	33

Figura 13- Comparação do crescimento do fungo <i>Aspergillus niger</i> quando submetido aos diversos tratamentos.....	33
Figura 14- (A) Ensaio do <i>Fusarium oxysporum</i> utilizando o metanol como solvente; (B) <i>Fusarium oxysporum</i> utilizando a água como solvente e (C) <i>Fusarium oxysporum</i> utilizando etanol como solvente	35
Figura 15- Comparação do crescimento do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> quando submetido aos diversos tratamentos.....	35
Figura 16- (A) Ensaio do <i>Penicillium purpurogenum</i> utilizando o metanol como solvente; (B) <i>Penicillium purpurogenum</i> utilizando etanol como solvente.....	37
Figura 17- Comparação do crescimento do fungo <i>Penicillium purpurogenum</i> quando submetido aos diversos tratamentos	37

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1- <i>Temperature Dependence of the Water Activity of Saturated Salt Solutions</i> (Fonte: DECAGON, 2015)	51
--	----

SIGLAS E ABREVIATURAS

AFB₁ – Aflatoxina B₁

AFB₂ – Aflatoxina B₂

AFG₁ – Aflatoxina G₁

AFG₂ – Aflatoxina G₂

a_w – Atividade da água

BHI – *Brain Heart Infusion*

BQ – 1,4-Benzoquinona

EBQ – etil-1,4-benzoquinona

HPLC – Cromatografia líquida de alto desempenho

HQ - Hidroquinona

HR – Humidade relativa

ISA – Instituto Superior de Agronomia

LOD - Limite de deteção

LOQ – Limite de quantificação

MBQ – metil-1,4-benzoquinona

MEA – Meio de malte agar

MICs – Concentração mínima inibitória

Mt – milhões de toneladas

OTA – Ocratoxina A

PDA – Meio de *Potato Dextrose Agar*

SDW – Água destilada esterilizada

t – toneladas

TCT – *Tribolium castaneum*

TSA – Agar de Soja Trípico

UFC – Unidades formadoras de colónias

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

O milho é dos cereais mais consumidos no mundo inteiro na alimentação humana e alimentação animal. Este cereal é utilizado como matéria-prima na indústria de modo a obter-se diversos produtos como massas alimentícias, pão, óleo e rações para animais.

As pragas dos cereais armazenados são um problema pois levam a perdas quantitativas e qualitativas como a redução de massa e a qualidade nutricional o que pode levar a um risco quanto à segurança alimentar das pessoas e dos animais.

1.1. O MILHO

1.1.1. IMPORTÂNCIA ECONÓMICA E ALIMENTAR DO MILHO

O milho (*Zea mays*) (L.) pertence à família das gramíneas (Gramineae). A planta do milho pode ser definida como um sistema metabólico muito eficiente cujo produto final é principalmente amido depositado em grãos. O grão representa cerca de 42% do peso seco da planta e geralmente apresenta uma cor branca ou amarela, embora também possa ter coloração negra, vermelha ou possuir uma mistura de cores (FAO, 1992). Este cereal tem uma grande adaptabilidade, representada por variados genótipos, o que permite o seu cultivo desde o Equador até altitudes superiores a 3600 metros. Encontra-se distribuído em climas tropicais, subtropicais e temperados e é cultivado em todas as regiões agrícolas do mundo (J. F. C. Barros & Calado, 2014).

O cultivado mais antigo tem cerca de sete mil anos e foi descoberto no México (FAO, 1992). A planta tem como finalidade de utilização a alimentação humana e animal, devido às suas elevadas qualidades nutricionais (J. F. C. Barros & Calado, 2014).

Nos países em desenvolvimento existe maior área de cultivo de milho do que nos países desenvolvidos. No entanto, o rendimento nos países desenvolvidos é cerca de quatro vezes maior do que nos países em desenvolvimento. Nestes países a maior parte da produção é para consumo humano enquanto que nos países desenvolvidos é, principalmente, para uso industrial e alimentação animal (FAO, 1992). A colheita do milho é fortemente mecanizada nos países desenvolvidos e feita manualmente nos países em desenvolvimento. Em ambas as situações, quando o milho é colhido, geralmente, apresenta um teor de água entre os 18 e os 24% (FAO, 1992).

Prevê-se que o consumo do milho vá aumentar cerca de 1,3% até 2027, principalmente para o uso da alimentação animal, aumentando a sua parcela atual de 56% para 58%. Para a alimentação humana, o consumo aumentará principalmente nos países em desenvolvimento, especialmente na África Subsaariana (OECD-FAO, 2018). Por outro lado, a produção global de milho deverá crescer 161 milhões de toneladas (Mt) para 1,2Mt na próxima década com os maiores aumentos a registar na China (31Mt), Brasil (24Mt), Estados Unidos (22Mt), União Europeia (11Mt) e Argentina (10Mt) (OECD-FAO, 2018).

1.1.2. ARMAZENAMENTO DO MILHO

O armazenamento de cereais é considerado um agroecossistema específico condicionado por diversos fatores como a temperatura, humidade relativa, teor de água e disponibilidade de oxigénio. Quando o armazenamento é efetuado em más condições podem ocorrer diversos problemas como o ataque por insetos e/ou fungos e assim são induzidas mudanças organoléticas (sabor e aparência), perdas nutricionais e contaminação por micotoxinas (Paim *et al.*, 2018).

Após a colheita, os grãos devem ser secos até teores de água de 12 a 14% de modo a obter um armazenamento seguro. O baixo teor de água e baixas temperaturas no armazenamento reduzem a deterioração do grão e o crescimento microbiano (FAO, 1992). As mudanças na qualidade do grão são resultado da colheita mecânica, descasque e secagem. A colheita mecânica e o descasque provocam danos externos ao grão e assim a entrada de insetos e fungos é mais fácil. Uma secagem muito rápida e conduzida a altas temperaturas induzirá à formação de fissuras no grão por tensão, inchaço e descoloração o que afetará a eficiência da moagem e outros processos (W. Kirleis & Stroshine, 1990).

A conservação eficiente do milho depende das características físicas, químicas e biológicas do grão, do período de armazenamento e o tipo de armazenamento. As características bióticas incluem todos os organismos vivos incluindo insetos, microrganismos, roedores e aves que, sob condições favoráveis ao seu desenvolvimento, utilizam o grão como fonte de alimento. Os fatores abióticos incluem a humidade relativa, temperatura e o tempo de armazenamento. Os efeitos dos fatores bióticos e dos fatores abióticos são influenciados pelas características físicas e bioquímicas do grão, pela baixa condutividade térmica do grão, a sua capacidade de absorção de água, a sua estrutura, a sua composição químicas, a sua taxa de respiração, a textura e os métodos e condições de secagem (FAO, 1992).

O controlo do local do armazenamento é importante porque num armazém repleto de cereais é o grão armazenado que determina e estabiliza a temperatura e as condições de humidade (Taruvunga, Mejia, & Alvarez, 2014). O teor de água e a humidade relativa estão igualmente interrelacionados: se o grão perder água devido a um aumento de temperatura ou não estiver suficientemente seco antes do armazenamento, esta água é libertada para o ar circundante e aumenta a humidade relativa na instalação de armazenamento. Esta é a razão pela qual é deveras importante que os produtos estejam devidamente secos antes de serem armazenados (Taruvunga *et al.*, 2014).

A colheita e o manuseamento adequado contribuem para reduzir a contaminação fúngica do milho (FAO, 1992). Existem por isso algumas linhas com orientações para minimizar e controlar os fungos de armazenamento (Atanda S. A, 2011):

- Secagem do produto rapidamente e de modo uniforme, após a colheita até um nível de humidade que não permita o desenvolvimento dos fungos. O teor crítico de água para o armazenamento seguro corresponde a uma atividade de água abaixo de 0,7;
- Prevenção de danos nos grãos durante a colheita, manipulação e secagem;

- Prevenir a condensação (armazenamento selado sob atmosfera modificada). Em grande escala, as áreas devem ser equipadas com instrumento para a medição e controlo da temperatura ambiente;
- Ventilação correta de modo a prevenir da absorção de água e promover a redução da temperatura;
- Evitar o desenvolvimento de populações de insetos.

Armazenar os cereais de modo adequado previne perdas significativas do produto e previne graves problemas de saúde (Paim *et al.*, 2018).

1.2. INSETOS NO MILHO ARMAZENADO

As pragas de insetos durante o armazenamento podem ser classificadas de acordo com duas categorias: pragas primárias e pragas secundárias. As pragas primárias são as que podem invadir um grão não danificado e estabelecer uma infestação apesar de serem igualmente capazes de se alimentar do grão danificado. Algumas pragas primárias, associadas ao armazenamento, podem igualmente começar o seu ataque no campo antes da colheita. As pragas secundárias atacam os grãos danificados ou atacados pelas pragas primárias durante o armazenamento (Taruvunga *et al.*, 2014).

Muitas pragas de produtos armazenados têm uma grande capacidade de dispersão e podem entrar e sair livremente das instalações de armazenamento. Machekano *et al.* (2018) consideraram que a chave para o controlo de pragas de produtos armazenados é explorar a possível conexão entre a infestação de residentes na massa dos grãos e as populações ao ar livre.

As pragas do armazenamento apresentam características comuns tais como: capacidade de produzir elevada descendência, um ciclo evolutivo é muito curto, início da reprodução logo após a emergência do adulto, adultos com dimensões reduzidas, elevada taxa de crescimento e capacidade para sobreviver em ambientes confinados e poucos ventilados (Barros, 2007).

1.2.1. PERDAS CAUSADAS POR INSETOS

Os insetos podem provocar prejuízos qualitativos e quantitativos ao produto armazenado. No entanto, na generalidade dos casos, são os prejuízos qualitativos os que apresentam maior notoriedade, estando os prejuízos quantitativos somente associados a infestações muito elevadas (Barros, 2007).

A prática mais comum para controlar insetos de grãos armazenados é o uso de pesticidas para prevenir e suprimir o desenvolvimento de insetos. A resistência dos insetos a estes pesticidas e a preocupação do consumidor relativamente ao uso de pesticidas nos alimentos provoca a necessidade de pesquisar métodos alternativos para o controlo de insetos, de modo a obter alimentos sem resíduos de pesticidas (Carvalho *et al.*, 2018). No entanto, o grão seco, com um teor de água inferior a 12 %, associado a temperaturas baixas, não permite o desenvolvimento da maioria das espécies de pragas de insetos. O teor de água e a temperatura elevados são fatores a evitar durante o armazenamento dado que essas condições propiciam o desenvolvimento de insetos (Carvalho *et al.*, 2019; Taruvunga *et al.*, 2014).

Os insetos de grãos armazenados têm certas preferências quanto às condições de temperatura, humidade relativa, teor de água e tipo de alimento. A interação desses fatores afeta, direta ou indiretamente, a taxa de crescimento dos insetos e suas populações, bem como a possibilidade de causar perdas durante o armazenamento dos produtos (Paim *et al.*, 2018).

1.2.2. *TRIBOLIUM CASTANEUM*

O *Tribolium castaneum* (Herbst) (**figs. 1 e 2**) pertence à ordem Coleoptera, família Tenebrionidae. É uma espécie de insetos nociva aos produtos armazenados, considerada praga secundária, polífaga em farinha e outros derivados dos cereais, vários alimentos secos, processados e/ou armazenados (El-Desouky *et al.*, 2018). É uma espécie cosmopolita que consegue sobreviver em ambientes extremamente secos e demonstra resistência a todas as classes de inseticidas (Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008).



Figura 1- Larva de *Tribolium castaneum* (A) e pupa de *Tribolium castaneum* (B)

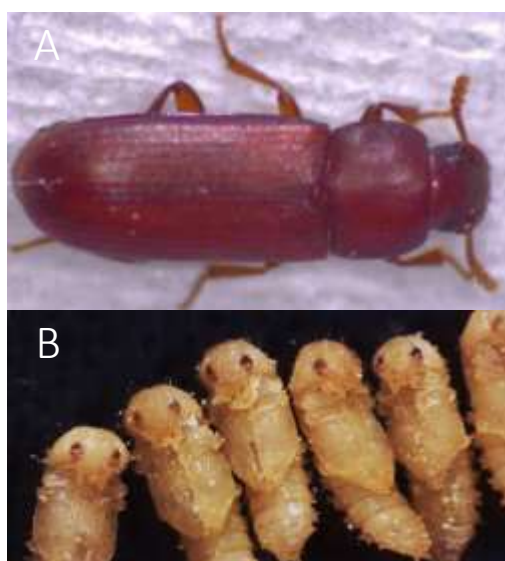


Figura 2- *Tribolium castaneum* adulto (A) e pupas de *Tribolium castaneum* (B)

T. castaneum tem 2,3 a 4,4 mm de comprimento, cor castanho-avermelhada, produz entre 150 a 600 ovos por fêmea, essencialmente 2,5 a 11 ovos por dia e por fêmea. O ciclo evolutivo é facilmente obtido em condições de laboratório, cerca de 20 dias à temperatura de 32 °C e 70 % de humidade relativa (Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008).

T. castaneum apresenta metamorfose completa, ou seja quatro fases distintas do ciclo evolutivo: ovo, larva, pupa e adulto (Sreeramoju *et al.*, 2016).

Os ovos são incolores e microscópios e a sua superfície é viscosa para que este se agarre às partículas dos alimentos. Os ovos eclodem, aproximadamente, em quatro dias, em condições de laboratório. As larvas deste inseto são finas, cilíndricas, de cor bege a amarelo com as cabeças castanhas. Cada larva tem seis patas com duas projeções bifurcadas na parte traseira. Durante este estágio, o inseto fará, aproximadamente, 12 mudas (libertando o seu exosqueleto - exúvias) até atingir a fase de pré-pupa. O período larvar pode durar cerca de 15 dias, variando de acordo, por exemplo, com as condições de crescimento, entre outros fatores. Após o estado de crescimento de larva passa para o estado de crescimento de pupa. A pupa tem uma cobertura externa fina e mantém-se num estado de quiescência, no qual os movimentos são muito limitados e não se alimenta. O estágio de pupa dura cerca de cinco dias e durante esta fase a pupa prepara-se completamente para se tornar um adulto. O inseto adulto é liso, brilhante e castanho claro com antenas e três pares de patas (Sreeramoju *et al.*, 2016).

O canibalismo assume um papel importante na redução de populações de *T. castaneum*, especialmente em condições de escassez de alimento e de sobrepovoamento dos habitats. Os adultos machos canibalizam as pupas e as fêmeas canibalizam os ovos (Barros, 2007). Portanto, a taxa de canibalismo é inversamente proporcional aos recursos alimentares disponíveis. Segundo Sreeramoju *et al.* (2016) o canibalismo pode também ser um comportamento relacionado com controlo genético.

Todos os insetos da família Tenebrionidae, como os *T. castaneum* e *T. confusum*, produzem secreções de proteção chamadas benzoquinonas. Existem diversos tipos destas substâncias, mas o *T. castaneum* especificamente, produz metil-1,4-benzoquinonas (MBQ) e etil-1,4-benzoquinonas (EBQ) (Lis *et al.*, 2011).

1.2.3. BENZOQUINONAS

Os adultos de *T. castaneum* excretam benzoquinonas (**Fig. 3**), através de glândulas de defesa. Estes compostos, especialmente as benzoquinonas monocíclicas libertadas pelos *Tribolium* spp., contaminam as farinhas conferindo um cheiro intenso (Lis *et al.*, 2011). Este inseto excreta metil-1,4-benzoquinona (MBQ) e etil-1,4-benzoquinona (EBQ) juntamente com o transportador alceno 1-pentadeceno (El-Desouky *et al.*, 2018).



Figura 3- 1,4-benzoquinona (BQ). Fonte: Sigma Aldrich

As benzoquinonas são compostos químicos derivados de benzenos, cíclicos, insaturados com dois grupos carbonilo. São muito solúveis em solventes orgânicos e têm uma coloração amarela, laranja ou avermelhada (Lis *et al.*, 2011). As benzoquinonas são comumente encontradas nas plantas e nos animais e são classificadas em três grupos (Lis *et al.*, 2011):

- Monocíclicas: incluindo a 1,4-benzoquinona e as benzoquinonas excretadas pelo *T. castaneum*;
- Bicíclicas: incluindo naftoquinonas e a vitamina K;
- Tricíclicas: incluindo as antraquinonas, como o corante de alizarina.

As benzoquinonas desempenham um papel importante na ecologia de *T. castaneum* adultos, pois conferem proteção contra eventuais predadores ou competidores, bem como contribuem para o controle da densidade populacional (Pappas & Wardrop, 1996).

De acordo com WHO-IARC (1999), as benzoquinonas não são classificáveis quanto à sua carcinogenicidade para seres humanos (Grupo 3). No entanto, estudos mais recentes referem que as benzoquinonas excretadas por *T. castaneum* podem ter um efeito tóxico em humanos e animais a partir de níveis elevados. Este efeito tóxico pode ser direto ou indireto, após uma série de reações enzimáticas e transformações através das vias metabólicas, as benzoquinonas podem tornar-se metabolitos secundários do benzeno, suprimindo e alterando as células e tecidos e provocando cancro (Lis *et al.*, 2011).

Segundo Pappas e Wardrop (1996), as benzoquinonas produzidas por *T. castaneum* são agentes mutagênicos e fungicidas poderosos, podendo ser até equacionado o seu uso como regulador de densidade populacional de fungos, ou até como inibidores de crescimento dos mesmos nos ambientes em que estes insetos estão presentes e excretam benzoquinonas. Foi também provado que as benzoquinonas têm efeito fungistático para a *Beauveria bassiana* (Fan *et al.*, 2015).

1.3. FUNGOS NO MILHO ARMAZENADO

Os fungos são um grupo de microrganismos eucariotas (Manaia, 2006) e pertencem ao reino *Fungi* (Atanda S. A, 2011). Têm um corpo unicelular com filamentos de ramificações multicelulares chamados hifas, onde se reproduzem assexuadamente por meio de esporos (Atanda S. A, 2011). Os fungos podem colonizar qualquer ambiente e podem propagar-se facilmente no ar, assim como em condições com muito pouco oxigénio, sendo alguns deles anaeróbios (Taruvunga *et al.*, 2014).

Muitos tipos de fungos são conhecidos naturalmente como produtores de micotoxinas, representando por isso um perigo potencial quando consumidos por seres humanos ou por animais. As micotoxinas mais perigosas são as aflatoxinas, que são letais e podem ser encontradas nos grãos previamente atacados por fungos e não são facilmente destruídas ou removidas por cozimento ou aquecimento do grão (Taruvunga *et al.*, 2014).

1.3.1. PERDAS CAUSADAS POR FUNGOS

A contaminação de cereais com fungos é uma preocupação global e constante (Mohapatra *et al.*, 2017) sendo que são conhecidas mais de 70 mil espécies de fungos mas poucas são encontradas nos cereais armazenados (Blackweel, 2011).

O crescimento dos fungos ocorre nos principais produtos derivados da agricultura, quer no campo quer durante o armazenamento, podendo causar prejuízos elevados (Taruvunga *et al.*, 2014). Os fungos são a principal causa de deterioração no milho armazenado e causam mudanças prejudiciais na aparência, quantidade e qualidade grãos armazenados, reduzindo assim o valor de uso final do milho em alimentos para consumo humano e animal, bem como biocombustíveis (Channaiah & Maier, 2014). Para além destes aspetos, a produção de micotoxinas é uma consequência perigosa da infestação por fungos (Magro *et al.*, 2006).

As principais perdas causadas por fungos no armazenamento dos cereais são descritas por diversos autores (Fleurat-Lessard, 2017; Villers, 2017; Atanda S. A, 2011):

- Redução de nutrientes disponíveis;
- Descoloração dos grãos;
- Aglomeração de grãos;
- Aumento da temperatura dos produtos armazenado, podendo até causar combustão espontânea;
- Cheiro e sabor a bolor;
- Produção de micotoxinas;
- Criação de ambiente propício para o desenvolvimento de espécies de insetos;
- Diminuição da capacidade de germinação.

1.3.2. FUNGOS DE CAMPO E FUNGOS DE ARMAZENAMENTO

Os fungos encontrados nos grãos e nas farinhas podem ser fungos de campo e fungos de armazenamento (Pitt & Hocking, 2009). Designam-se fungos de campo os que invadem a planta ainda no campo e designam-se fungos de armazenamento os que invadem os produtos colhidos depois da colheita (Atanda S. A, 2011). Em muitos casos, não é possível uma distinção nítida pois os fungos podem vir do campo e crescer nas condições de armazenamento, sendo que a origem destes fungos foi o campo. Os fungos de armazenamento incluem todas as espécies pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* sendo que o crescimento dos fungos em condições de armazenamento é principalmente regulado pelos seguintes fatores (Atanda S. A, 2011):

- a) Composição de nutrientes do grão;
- b) Condições de humidade e temperatura;
- c) Fatores bióticos como a presença de insetos dos produtos armazenados.

Os fungos de campo necessitam de teor de água elevado para sobreviver, daí que não sejam predominantemente encontrados nos cereais durante o armazenamento (Ahmad & Singh, 1991). Os fungos de armazenamento invadem os grãos durante o armazenamento e possuem uma taxa de crescimento muito rápida, em condições ótimas de crescimento (Magan *et al.*, 2010). Após o crescimento rápido, estes fungos do armazenamento, desenvolvem *hotspots* onde causam danos qualitativos e quantitativos (Mohapatra *et al.*, 2017), como por exemplo, a contaminação por produção de micotoxinas, causando danos irreparáveis nos grãos armazenados (Tsehaye *et al.*, 2017; Magan *et al.*, 2010).

Os fungos de armazenamento requerem uma humidade relativa (HR) de pelo menos 65% ou uma atividade da água (a_w) de 0,65, o que indica um teor de água do produto de 13%, aproximadamente (Atanda S. A, 2011). Os fungos de armazenamento desenvolvem-se a temperatura entre os 10 e os 40 °C. Os fatores determinantes no crescimento de fungos de produtos armazenados (Atanda S. A, 2011) são:

- Atividade da água (a_w);
- pH;
- Temperatura;
- Tensões de gases, especificamente de oxigénio (O_2) e dióxido de carbono (CO_2);
- Estado nutricional;
- Conservantes;
- Outros fatores, tais como grãos danificados durante a colheita, manipulação e/ou secagem.

Como todos os organismos vivos, os fungos requerem água para o crescimento. No entanto, alguns fungos têm a capacidade de crescer mesmo com valores de a_w baixos (Atanda, 2011). A atividade da água (a_w) que demonstra a relação entre o teor de água dos alimentos e a capacidade dos microrganismos crescerem sobre eles. Os fungos de armazenamento podem crescer a uma a_w de 0,70

a 0,75 em comparação aos fungos de campo que necessitam de maior atividade da água para sobreviver ($> 0,9$) (Fleurat-Lessard, 2017).

Alguns fungos de armazenamento têm capacidade de crescer em ambientes secos, onde a germinação dos esporos fúngicos e o crescimento de fungos é possível (Pitt & Hocking, 2009). Assim, produtos armazenados com umidade relativa entre 75 e 85 % são suscetíveis ao ataque de fungos xerofílicos (capaz de crescer a $a_w < 0,85$) durante o tempo de armazenamento (alguns meses).

A temperatura é um fator muito importante no crescimento dos fungos. Temperaturas abaixo dos 20 °C tendem a favorecer fungos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Cladosporium*, por exemplo. Por outro lado, temperaturas mais elevadas favorecem as espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* (Atanda S. A, 2011).

Principais gêneros de fungos de armazenamento:

***Aspergillus* Fr.: Fr.**

As espécies do gênero *Aspergillus* são reconhecidas pelos conidióforos típicos, com uma vesícula terminal que suporta as células conidiogênicas e uma célula pé inserida na hifa vegetativa. As fiálides podem ser produzidas diretamente na vesícula ou sobre métula (células estéreis). Os conídios possuem uma forma globosa a subglobosa, são amerósporos hialinos e formam cadeias basípetas. Podem apresentar diversas cores, como por exemplo, branco, amarelo, amarelo acastanhado, castanho, preto e ainda diversas tonalidades de verde (Magro, 2009; Pitt & Hocking, 2009).

***Penicillium* Link**

As espécies do gênero *Penicillium* são conhecidas pelos conidióforos simples ou ramificados em forma de vassoura, que terminam em fiálides onde são produzidos os conídios. Os conídios são hialinos e esverdeados, amerósporos, globosos ou ovóides, formando cadeias basípetas. O micélio vegetativo é hialino, com hifas septadas regularmente. As colônias têm um aspeto aveludado e pulverulento, com diversas cores (Magro, 2009; Pitt & Hocking, 2009).

***Fusarium* Link**

As espécies do gênero *Fusarium* caracterizam-se pela produção de conídios hialinos, mais ou menos arqueados ou falciformes, subcilíndricos ou fusóides, fragmósporos com numerosos septos transversais e uma célula basal diferenciada, agregados em massas mucilaginosas ou solitários. Os conidióforos são septados e diversificados quanto às dimensões e ramificações. Para além dos conídios típicos deste gênero podem ainda encontrar-se microconídios, unicelulares ou poucos septos, ovóides, ligeiramente curvados ou fusiformes. Podem existir ou não, dependendo da espécie em estudo, clamidósporos, de origem micelial lisos ou equinulados, terminais ou intercalares. O micélio vegetativo é hialino com hifas septadas regularmente. As colônias têm um crescimento rápido, com aspeto plano, algodado e apresentam diversas cores (Magro, 2009; Pitt & Hocking, 2009).

1.3.3. MICOTOXINAS

As micotoxinas são compostos químicos, tóxicos, produzidos como metabólitos secundários pelos fungos filamentosos. Estes metabólitos são produzidos principalmente, mas não exclusivamente, quando o fungo atinge a maturidade (Assunção, 2017). São conhecidas mais de 500 micotoxinas (Krska *et al.*, 2008). A contaminação por fungos e a produção de micotoxinas pode começar em diferentes fases: no campo, na colheita, no armazenamento e no processamento dos cereais (Neme & Mohammed, 2017). Geralmente, as micotoxinas são compostos quimicamente e termicamente estáveis, sobrevivendo ao armazenamento e à maioria dos processos de produção (Köppen *et al.* 2010). Algumas operações no processamento dos alimentos podem ser efetuadas de forma a provocar efeitos sobre as micotoxinas, tais como a seleção manual ou triagem, higienização adequada dos equipamentos na moagem, remoção de produtos contaminados, tratamentos térmicos, uso de irradiação, extrusão e tratamento com produtos químicos, entre outros (Mohapatra *et al.*, 2017).

Os fungos mais importantes na produção de micotoxinas em alimentos e rações são as espécies pertencentes aos géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, e *Fusarium* (Atanda, 2011).

As micotoxinas podem ser transferidas para humanos e animais após a ingestão de cereais contaminados através de uma exposição direta desses cereais às micotoxinas nas etapas da secagem, processamento e/ou armazenamento (Mohapatra *et al.*, 2017). Na maioria dos casos, as micotoxinas são formadas no campo mas a sua quantidade aumenta durante a colheita, secagem e armazenamento. O fator mais importante neste processo de produção de micotoxinas é a disponibilidade de água para o crescimento dos fungos produtores das mesmas. A temperatura também é, no entanto, um fator importante (Beachler, 2003). As principais micotoxinas, os fungos produtores de micotoxinas e a ocorrência nos géneros alimentícios encontram-se representadas no **Quadro 1**.

Segundo a Organização Mundial de Saúde e a Agência Internacional de Pesquisa do Cancro - WHO-IARC (1994), as aflatoxinas são classificadas como carcinogénicas para os humanos (Grupo 1) enquanto as ocratoxinas e as fumonisinas são classificadas como possíveis carcinogénicos (Grupo 2). As micotoxinas podem provocar diarreias, vómitos, diminuição do apetite, doença pulmonar, inflamação gastrointestinal, falhas no crescimento, cancro, imunossupressão e até morte em animais (Shukla *et al.*, 2008).

Quadro 1- Principais grupos de micotoxinas, espécies de fungos produtores e gênero alimentício (adaptado de Alvito, 2014)

Micotoxina	Espécie de fungos produtores	Gênero alimentício
Aflatoxinas	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Cereais (trigo, cevada, sorgo e arroz), figos, nozes e outros frutos de casca rija, tabaco, amendoins e leite de animais como vacas, cabras e ovelhas
Ocratoxina A	<i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. auricomus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>A. glaucus</i> , <i>A. melleus</i> , <i>A. niger</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Cereais (cevada, trigo, milho e aveia) e seus derivados, café e vinho
Fumonisin	<i>Fusarium moniliforme</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. nygamai</i> , <i>F. verticillioides</i>	Culturas de milho e sorgo
Tricotecenos	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. proliferatum</i> , <i>F. nygamai</i> , <i>F. verticillioides</i> Espécies dos gêneros <i>Myrothecium</i> , <i>Phomopsis</i> , <i>Stachybotrys</i> , <i>Trichoderma</i> e <i>Trichothecium</i>	Cereais
Zearalenona	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. sporotrichioides</i>	Cereais (principalmente milho), bananas e tomate

As aflatoxinas são toxinas naturais produzidas por certas espécies de fungos, sendo os mais relevantes o *A. flavus* e o *A. parasiticus*; são consideradas as toxinas mais tóxicas (Benbrook, 2005). O grupo das aflatoxinas incluem cinco compostos: B1, B2, G1, G2 e M1 (resultante da hidrólise da AFB1), sendo que a aflatoxina B1 é a mais tóxica em relação às outras micotoxinas e a que ocorre com maior frequência. As aflatoxinas podem afetar diversos alimentos tais como cereais, oleaginosas, especiarias, nozes, leite e carnes. A concentração de aflatoxinas varia ao longo do tempo, nas diversas etapas, em milho (Neme & Mohammed, 2017) (**fig. 4**). Quanto maior os danos dos insetos, antes da colheita, secagem lenta após colheita e más condições de armazenamento maior a concentração de aflatoxinas ao longo do tempo.

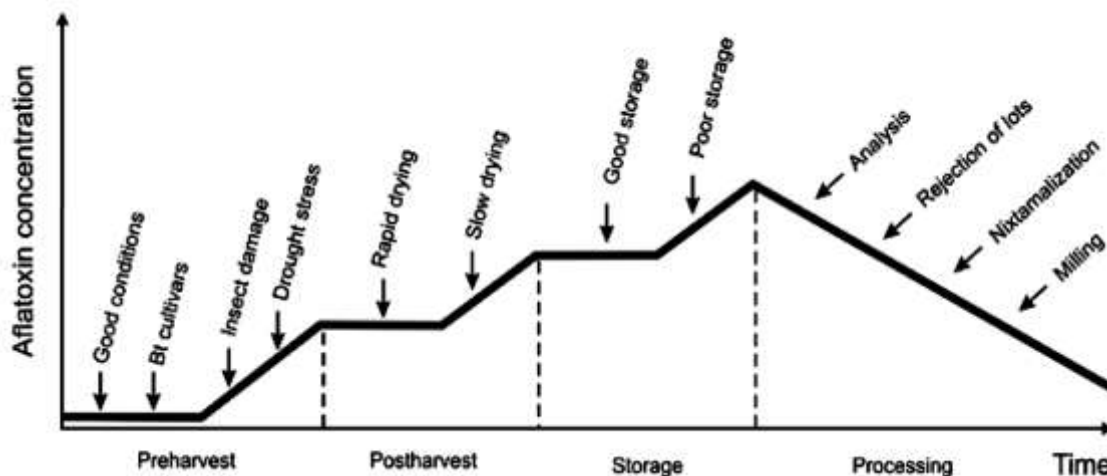


Figura 4- Concentração de aflatoxinas ao longo do tempo em milho (Fonte: Neme & Mohammed, 2017)

As ocratoxinas são micotoxinas produzidas principalmente por espécies pertencentes aos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, particularmente *A. ochraceus* e *P. verrucosum*, que produzem a ocratoxina A (OTA) (Neme & Mohammed, 2017). A ocratoxina A ocorre em diversos alimentos mas principalmente em grãos de cereais (Clark & Snedeker, 2006). A ocratoxina A afeta principalmente o rim, podendo danificar o fígado em altas concentrações. Esta micotoxina é nefrotóxica, imunossupressora, teratogênica e carcinogênica para animais e foi classificada como possível agente carcinogênico humano (Neme & Mohammed, 2017).

1.4. BACTÉRIAS NO MILHO ARMAZENADO

As bactérias são organismos unicelulares, cuja multiplicação se dá simplesmente por divisão celular. São incapazes de penetrar no tecido intacto do grão, sendo necessário que existam aberturas naturais ou ferimentos causados por insetos, ou tecidos apodrecidos (Faroni, 1998).

As bactérias são um problema de saúde pública, principalmente as que contaminam os alimentos (McLauchlin *et al.*, 2004).

Apesar dos fungos serem os principais agentes de deterioração dos cereais armazenados, as bactérias são contaminantes superficiais frequentes. Para que as bactérias cresçam nos grãos elas necessitam de humidades relativas muito elevadas (> 90 %) e atividade da água em equilíbrio com essa humidade relativa. Geralmente, as bactérias não estão significativamente envolvidas na deterioração do grão seco mas aparecem numa fase posterior à deterioração extensiva do grão (Heredia *et al.*, 2009). No entanto, acima de 90 % de humidade relativa as bactérias tornam-se tão importantes quanto os fungos (Faroni, 1998).

A microflora dos grãos armazenados é formada por uma grande variedade de microrganismos nomeadamente bactérias. Quando o grão está armazenado, as bactérias estão, normalmente, em estado de dormência. Em contrapartida, o ambiente inerte (temperatura, humidade relativa, oscilação do O₂ e CO₂) podem sofrer transformações. Uma elevada temperatura pode estimular o desenvolvimento de bactérias. Os cereais são infetados quando o teor de água dos grãos excede os

13,5 % e a temperatura ótima para a infecção é de 27 °C. As temperaturas muito altas e muito baixas inibem o desenvolvimento da maioria das bactérias (Faroni, 1998). As espécies bacterianas que podem ocorrer nos grãos são geralmente não patogênicas para o homem, embora a contaminação com agentes patogênicos bacterianos como *Salmonella* sp., *Escherichia coli* e *Bacillus cereus* possa acontecer (Hocking, 2003).

A presença de bactérias como *Salmonella* sp. e *E. coli* é geralmente uma indicação de que aves e roedores estiveram presentes, pois estas bactérias são entéricas. Isto pode ocorrer durante a colheita, mas normalmente deve-se ao resultado da falta de higiene na etapa do transporte, ou ao controle indevido de pragas durante o armazenamento (Hocking, 2003). A maioria dos grãos destinados à alimentação humana passa pela moagem onde existe a transformação dos grãos em farinha ou outros produtos como a sêmola, gérmen e farelo. O processo de moagem pode contribuir para o aumento da carga microbiológica da farinha. No entanto, a farinha passa por tratamentos térmicos que matam a maioria das bactérias (Hocking, 2003).

No presente trabalho, os testes laboratoriais para avaliar a atividade bacteriana das benzoquinonas foram efetuados com as seguintes espécies de bactérias:

- ***Escherichia coli* T. Escherich**

As bactérias do género *E. coli* são bactérias Gram-negativas que pertencem à família Enterobacteriaceae. As células têm a forma de bastonetes (bacilos) e podem ser imóveis ou móveis por flagelos. São bactérias anaeróbias facultativas, ou seja, crescem na presença ou na ausência de oxigénio) (ASAE, 2019a). Esta bactéria tem um crescimento ótimo a uma temperatura de 37 °C. As estirpes patogênicas sobrevivem, geralmente, às temperaturas de refrigeração, apesar de ocorrer uma ligeira redução após uma a cinco semanas de armazenamento. No caso da *E. coli* não ocorre qualquer redução mesmo quando os produtos são armazenados a -20 °C. O limite mínimo de atividade da água que permite o crescimento de *E. coli* é 0,95.

- ***Listeria monocytogenes* Pirie**

A *L. monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa pertencente à família Listeriaceae (Mastronicolis *et al.*, 2006). As células têm a forma de pequenos bastonetes e a sua mobilidade é conferida por flagelos (ASAE, 2019b). A temperatura ótima de crescimento desta bactéria encontra-se entre os 30 e os 37 °C. No entanto, pode sobreviver por longos períodos de tempo em alimentos congelados. O crescimento de *L. monocytogenes* é favorecido em condições de anaerobiose.

OBJETIVOS DO TRABALHO

O presente trabalho insere-se no plano de trabalho do projeto SafeGrain – Contaminação de cereais e derivados armazenados por pragas de insetos e fungos (Ref: PTDA/ASP-PLA/28350/2017) financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT).

Os objetivos deste trabalho são:

- 1) Investigar a influência da presença de insetos na microbiota das farinhas de milho, bem como na produção de micotoxinas por parte desses fungos;
- 2) Analisar o efeito das benzoquinonas sobre fungos das farinhas de milho e sobre bactérias.

CAPÍTULO 2 – MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

2.1.1. FARINHA DE MILHO

Para os ensaios utilizou-se milho amarelo inteiro, cedido pelo produtor Francisco Chia, proveniente do campo, sem tratamento prévio contra pragas e fungos, congelado durante 15 dias.

Para a obtenção da farinha trituraram-se, aproximadamente, 4000 g de milho amarelo em grão num moinho de cereais, de modo a quebrar a estrutura do grão. De seguida, para obter uma granulometria mais fina utilizou-se a Bimby TM 31 (Alemanha) (início na velocidade 5 e término na velocidade 9; 20 segundos em cada velocidade). Por último, peneirou-se a farinha, utilizando o Agitador *Fritsch analysette* (*Fritsch*, Alemanha) com um crivo FRB de malha 60 de 250 µm, de modo a obter-se farinha de milho mais fina.

2.1.2. INSETOS

Os insetos utilizados são descendentes de larvas retiradas de culturas existentes no laboratório de Entomologia, do Edifício Ferreira Lapa do Instituto Superior de Agronomia. As culturas referidas provêm de indivíduos selvagens capturados há menos de cinco anos e são mantidas numa mistura de farinha de trigo e levedura de cerveja (*Saccharomyces cerevisiae* Hansen), numa proporção de 95 para 5 numa estufa de incubação à temperatura de 26 °C, segundo Haines (1991).

Para a cultura de *T. castaneum*, colocaram-se insetos adultos em frascos com farinha de milho, em ambiente controlado com 30 ± 1 °C de temperatura e 70 ± 2 % de humidade relativa (Fitoclima S600, controlador ClimaPlus 400 (ARALAB, Portugal), até se obterem larvas do último instar e pupas. Dividiram-se as larvas e as pupas por frascos e registou-se a quantidade e a data de modo a facilitar o controlo do desenvolvimento do inseto. O acompanhamento do crescimento dos insetos foi efetuado de forma a obter adultos recém - emergidos para efetuar os ensaios programados (Sreeramoju *et al.*, 2016).

2.2. PARÂMETROS

2.2.1. TEOR DE HUMIDADE

Para a determinação do teor em humidade da farinha de milho, nas diferentes condições de temperatura e humidade, utilizou-se uma balança para a medição de humidade (PMB202 ADAM, Reino Unido), com amostras de 5 g e fizeram-se três repetições (AACC, 1999).

2.2.2. ATIVIDADE DA ÁGUA (a_w)

Para realizar as leituras dos valores de a_w das diferentes farinhas ligou-se previamente o banho a 20 ± 2 °C do termostato de circulação (*HAAKE GH- fisons, Labo Controle, Alemanha*). Colocou-se a amostra na sonda (*rotronic-HygroPalm, Alemanha*) e iniciou-se a medição, sendo que o resultado foi obtido ao fim de cerca de cinco minutos. Foram realizadas três réplicas para cada amostra. O equipamento foi devidamente calibrado de acordo com os valores tabelados (**Anexo 1**).

2.3. ENSAIOS

A metodologia adotada nesta dissertação de mestrado está representada de forma resumida na **figura 5**.

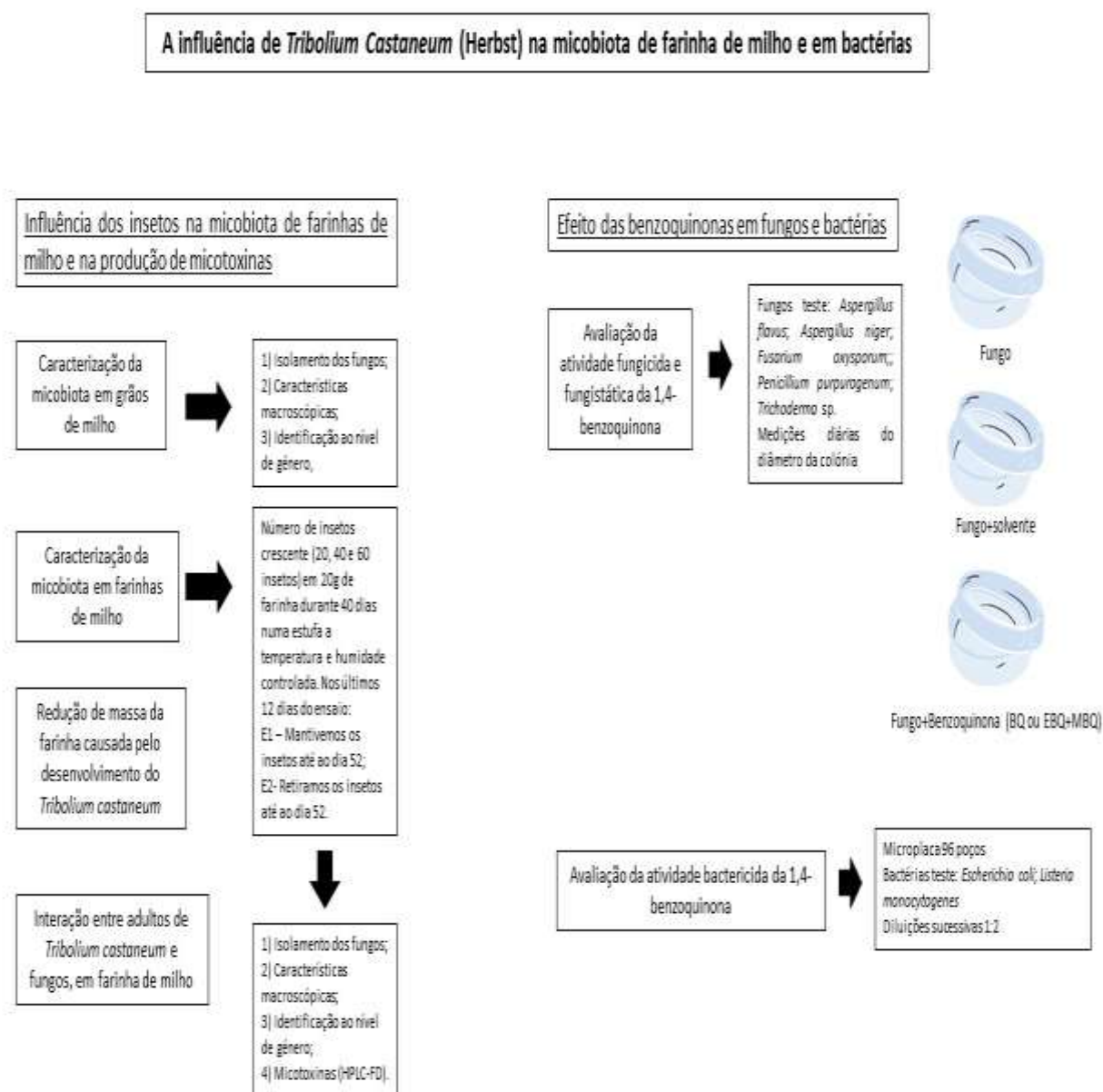


Figura 5- Esquema resumo dos materiais e métodos

2.3.1. CARACTERIZAÇÃO DA MICBIOTA EM GRÃOS DE MILHO

As condições iniciais dos grãos e farinha de milho quanto à infestação por fungos e micotoxinas (estas determinadas apenas em farinha), foram avaliadas através da identificação dos fungos presentes e da avaliação da presença de micotoxinas produzidas por esses mesmos fungos.

Para este ensaio, utilizaram-se amostras de grãos de milho inteiros para a determinação da micobiota e farinha de milho para a determinação de micotoxinas. As amostras foram separadas em frascos estéreis de 200 g e guardadas à temperatura de 4 °C até serem analisadas.

Isolamento dos fungos

Procedeu-se ao isolamento dos fungos segundo Magro (2009) e à sua posterior identificação. Os grãos foram distribuídos por 10 caixas de Petri, cinco contendo, aproximadamente, 20 ml de PDA (*Potato Dextrose Agar*) e cinco contendo dois papéis de filtro. Nas caixas com papel de filtro foi colocada água destilada esterilizada (SDW) para conferir humidade ao papel. As caixas de Petri, o meio de cultura e os papéis de filtro foram devidamente esterilizados.

Em cada caixa de Petri foram colocados 10 grãos de milho de forma equidistante. As caixas foram identificadas e colocadas numa estufa à temperatura de 27 °C durante sete dias. Após os sete dias de crescimento fúngico observaram-se as colónias, utilizando uma lupa binocular (M8, WILD) e um microscópio ótico (ORTHOLUX II, Leitz, Alemanha).

Cada colónia foi repicada para uma nova caixa de Petri contendo, aproximadamente, 20 ml de PDA. As caixas de Petri incubaram numa estufa de incubação à temperatura de 27 °C, durante sete dias. Sempre que necessário executaram-se repicagens sucessivas para obtenção de culturas puras.

Características macroscópicas

A caracterização macroscópica dos fungos selecionados foi feita a partir do crescimento em caixas de Petri com malte agar (MEA). Para esse efeito, colocou-se um inóculo central com o diâmetro de 5 mm do fungo pretendido. Estes inóculos foram obtidos da margem de um pré-inóculo em crescimento ativo. As caixas de Petri inoculadas foram colocadas numa estufa de incubação à temperatura de 27 °C durante sete dias. Após esse período fez-se a descrição a olho nu das colónias relativamente à medida da colónia, à frente de crescimento, à zonagem, à densidade do micélio, ao aspeto do micélio e à cor (Roger, 1970).

Identificação ao nível de género (*Câmaras de Riddell*)

Para a identificação genérica de todas as culturas puras utilizaram-se câmaras de *Riddell*. Colocou-se sobre a lâmina de vidro esterilizada colocou-se um quadrado de meio de cultura com uma espessura muito fina. Em seguida, inoculou-se o fungo isolado em duas extremidades opostas desse mesmo quadrado e cobriu-se com uma lamela. A lâmina inoculada foi colocada numa caixa de Petri, sobre uma vareta de vidro em forma de V que se encontrava mergulhada numa fina película de água destilada

esterilizada (SDW), de forma a criar uma câmara húmida. Em seguida colocou-se esta caixa de Petri numa estufa de incubação à temperatura de 27 °C durante alguns dias. Observou-se diariamente a evolução do crescimento fúngico, até se visualizar uma rede de hifas na superfície da lâmina e da lamela. Foram também preparadas lâminas rápidas a partir do meio de cultura utilizado para o crescimento do fungo, utilizando uma gota de água ou uma gota de lactofenol com azul de algodão de modo a obter-se preparações para depois serem observadas no microscópio ótico registando-se as características genéricas micro-morfológicas dos fungos em estudo.

Para a identificação dos fungos isolados recorreu-se a manuais de identificação e respetivas chaves dicotómicas dos autores: Samson (2015), Pitt & Hocking (2009). Estas chaves utilizam características culturais, estruturas morfológicas e reprodutoras.

2.3.2. CARACTERIZAÇÃO DA MICOBIOTA DA FARINHA DE MILHO

Para a determinação e avaliação da interação entre *T. castaneum* e a produção de fungos, com a possível produção de micotoxinas, elaboraram-se dois tipos de ensaios distintos durante 52 dias:

ENSAIO 1: Colocou-se um número de insetos crescente em cada frasco: 20 insetos, 40 insetos e 60 insetos, com 20 g de farinha de milho, durante 40 dias, numa câmara condicionada (30 ± 1 °C de temperatura; 70 ± 2 % de humidade relativa). Nos últimos 12 dias os ensaios foram colocados numa estufa (27 °C de temperatura; aproximadamente 75 % de humidade relativa). Os insetos mantiveram-se ativos nas farinhas durante todo o ensaio;

ENSAIO 2: Colocou-se um número de insetos crescente em cada frasco: 20 insetos, 40 insetos e 60 insetos, com 20 g de farinha de milho, durante 40 dias, numa câmara condicionada (30 ± 1 °C de temperatura; 70 ± 2 % de humidade relativa). Após 40 dias retiraram-se os insetos adultos, as pupas e as larvas e as farinhas foram colocadas numa estufa (27 °C de temperatura; aproximadamente 75 % de humidade relativa) durante 12 dias.

Foram efetuadas cinco repetições de cada tipo de ensaio, bem como cinco ensaios controlo, sem insetos, durante os 52 dias, onde permaneceram numa câmara condicionada (30 ± 1 °C de temperatura; 70 ± 2 % de humidade relativa) que os ensaios descritos em 1) e 2).

Micobiota da farinha de milho (Magro, 2009)

Amostragem e preparação da amostra

A amostra utilizada nos ensaios foi farinha de milho, com ou sem insetos. Foram retiradas 0,25 g de cada repetição, para um vidro de relógio devidamente esterilizado, onde se guardou numa caixa de Petri até ser analisado. Analisaram-se 35 amostras no total dos dois ensaios.

Isolamento dos fungos

A farinha foi colocada em caixas de Petri contendo, aproximadamente, 20 ml de PDA com cloranfenicol, para prevenir o crescimento de bactérias. As caixas de Petri e o meio de cultura foram devidamente

esterilizados. Em cada caixa foi colocado 0,25 g de amostra, distribuída uniformemente por toda a caixa. As caixas foram identificadas e colocadas numa estufa de incubação à temperatura de 27 °C durante sete dias. Após os sete dias de crescimento fúngico observaram-se as colónias, utilizando uma lupa binocular e um microscópio ótico.

Cada colónia foi repicada para uma nova caixa de Petri contendo, aproximadamente, 20 ml de PDA. Estas caixas foram a incubar numa estufa a 27 °C, durante sete dias. Sempre que necessário executaram-se repicagens sucessivas para obtenção de culturas puras.

Características macroscópicas

A caracterização macroscópica dos fungos selecionados foi efetuada como descrito anteriormente no ponto 2.3.1.

Identificação ao nível de género (*Câmaras de Ridde!!*)

A identificação genérica de todas as culturas puras foi efetuada como descrito anteriormente no ponto 2.3.1.

2.3.3. PRODUÇÃO DE MICOTOXINAS

A determinação inicial de micotoxinas (Aflatoxinas e Ocratoxina A) foi efetuada segundo (Martins *et al*, 2018) no Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, Departamento de Alimentação e Nutrição na Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Foram analisadas em cada análise, amostras de 10 g de farinha de milho, em duplicado, para além de curva de calibração com os padrões das toxinas e uma amostra contaminada para confirmação da recuperação.

Foram analisadas uma amostra de cada tratamento de insetos, para cada ensaio, no total de seis amostras e uma de controlo.

No **quadro 2** apresenta-se um resumo das condições cromatográficas usadas na determinação de micotoxinas: aflatoxinas totais (B1, B2, G1, G1, M1) e ocratoxina A, segundo o método descrito em Martins *et al*. (2018). Os parâmetros de validação do método cromatográfico usado na determinação encontram-se no **quadro 2**. Os cromatogramas relativos a uma amostra de milho e uma amostra de milho contaminada com padrões destas micotoxinas apresentam-se na **figura 6**.

Quadro 2- Resumo dos parâmetros de validação do método cromatográfico usado na determinação de aflatoxinas totais e ocratoxina A e teores máximos legislados.

	Aflatoxinas (µg/kg)	Ocratoxina A (µg/kg)
Curva calibração (gama de concentrações analisadas) (µg/kg)	0.05-0.5	0.2-2
R² (Coeficiente de determinação)	0.9979	0.9980
Limite de deteção - LOD (µg/kg)	0.02	0.07
Limite de quantificação - LOQ (µg/kg)	0.05	0.20
Recuperação (%) (EC 401/2006)	64-77	72
Teores máximos nos alimentos (EC 1881/2006)	5 (AFB1)-10 (Aflatoxinas totais)	3

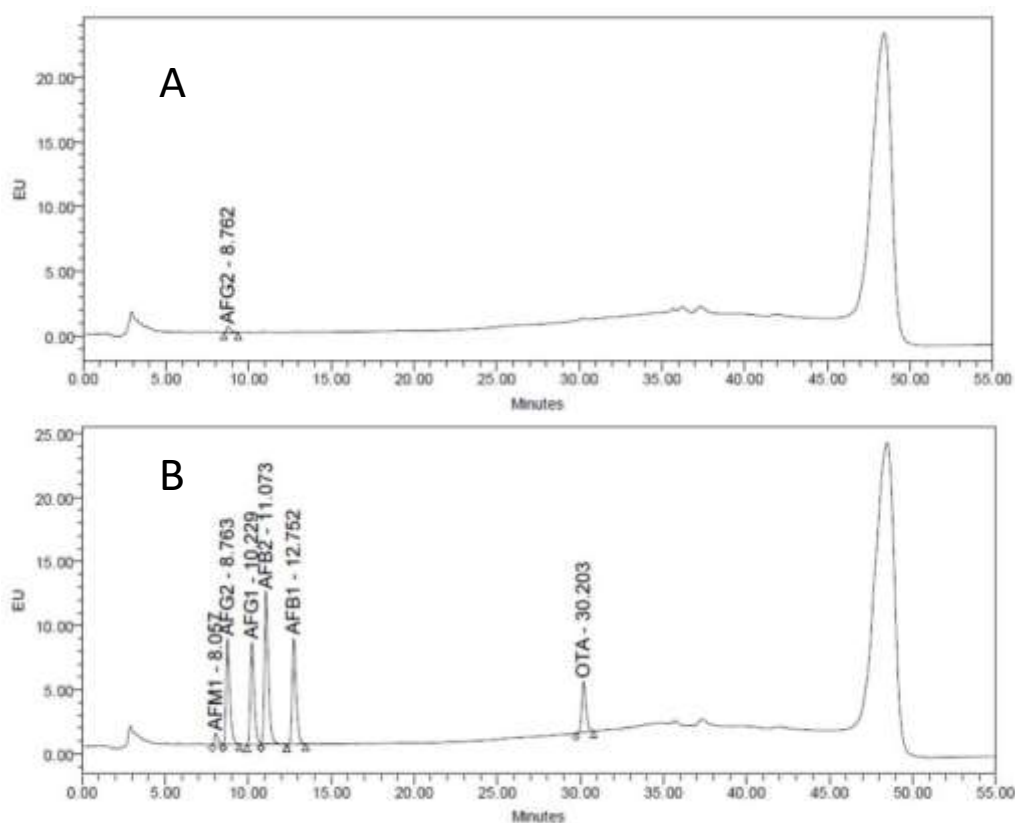


Figura 6- Cromatogramas relativos à análise de aflatoxinas (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2 e AFM1) e ocratoxina A (OTA) por HPLC com fluorescência em farinha de milho: A (Amostra de milho) e B (Amostra de milho contaminada com as condições do método utilizado).

2.3.4. REDUÇÃO DE MASSA DA FARINHA CAUSADA PELO DESENVOLVIMENTO DO *TRIBOLIUM CASTANEUM*

Após os 40 dias do segundo ensaio (2) do ponto 2.3.2., procedeu-se à retirada dos insetos adultos, pupas e das larvas e registo do peso da farinha. Foi ainda registado o número de insetos presentes e as condições do papel de filtro utilizado neste ensaio.

2.3.5. INTERAÇÃO ENTRE ADULTOS DE *TRIBOLIUM CASTANEUM* E FUNGOS, EM FARINHA DE MILHO

De forma a avaliar a interação entre o inseto adulto e os fungos a nível macroscópico e a sobrevivência do inseto num ambiente de stress, colocaram-se 3 g de farinha de milho em caixas de Petri com papel de filtro humedecido com 4 ml de água destilada esterilizada (SDW). As caixas de Petri e os papéis de filtro foram devidamente esterilizados. Efetuaram-se dois ensaios, com três repetições para cada tratamento de insetos (20 insetos, 40 insetos e 60 insetos):

1) Os insetos foram colocados em simultâneo com o papel de filtro humedecido e com a farinha na caixa de Petri. Estes ensaios foram colocados numa estufa de incubação à temperatura de 27 °C, durante sete dias, com observação diária;

Colocou-se a farinha com o papel de filtro humedecido numa estufa de incubação à temperatura 27 °C de modo a obter crescimento fúngico. Após o crescimento fúngico, foram colocados os insetos (20 insetos, 40 insetos e 60 insetos). O ensaio durou sete dias, com observações diárias da mortalidade dos insetos ou das alterações dos fungos.

2.4. EFEITO DAS BENZOQUINONAS SOBRE FUNGOS E BACTÉRIAS

2.4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA E FUNGISTÁTICA DA 1,4 – BENZOQUINONA

Segundo Unruh *et al.* (1998), cada *T. castaneum* produz, em média, um total de 45 µg 1,4-benzoquinona, correspondendo no caso desta espécie de inseto ao somatório de etill-1,4-benzoquinona + metil-1,4-benzoquinona. Desta forma, foram efetuados ensaios com etill-1,4-benzoquinona (EBQ) + metil-1,4-benzoquinona (MBQ) e ainda com 1,4-benzoquinona (BQ). Pretendia-se mimetizar a atividade de 60 insetos, assim utilizaram-se as seguintes quantidades: EBQ – 2,7 µg x 60 + MBQ – 1,8 µg x 60 e 2,7 mg de BQ em cada ensaio.

Os compostos MBQ e BQ foram adquiridos comercialmente na *Sigma Aldrich* (Alemanha), a EBQ foi adquirida na Chemspace. A BQ foi dissolvida em dois solventes distintos: água destilada esterilizada (SDW) e metanol. A mistura entre MBQ e EBQ foi dissolvida em etanol. A escolha dos solventes foi

efetuada de acordo com indicações de solubilidade das substâncias. Os ensaios foram realizados em caixas de Petri contendo 20 ml de PDA.

Colocou-se sobre a superfície do PDA, aproximadamente 3 mg de BQ e 3 mg da mistura EBQ + MBQ, previamente diluídas em cada um dos solventes. Para a sua dispersão uniforme na superfície do PDA utilizaram-se 10 pérolas de vidro devidamente esterilizadas.

Cada caixa de Petri foi inoculada, no centro, com um disco de micélio de cada espécie de fungo de 5 mm de diâmetro (inóculo sólido padronizado), retirado da periferia da colónia dos fungos. Efetuaram-se três a cinco réplicas para cada espécie de fungo e ainda ensaios controlo (com fungos apenas e controlo com cada solvente). Todas as caixas de Petri foram incubadas numa estufa de incubação a 28 °C, durante oito dias, tendo sido medido diariamente, o diâmetro da colónia.

2.4.2 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BACTERICIDA DAS 1,4-BENZOQUINONAS

Os ensaios de determinação da concentração inibitória do crescimento bacteriano foram realizados no Instituto Superior de Agronomia, no departamento dos Recursos Naturais, Ambiente e Território. Neste ensaio foram utilizadas duas espécies de bactérias, obtidas através de culturas presentes no ISA: *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Efetuaram-se duas repicagens das culturas bacterianas em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) (Biokar, França), durante 24 a 48 h, a uma temperatura de 37 °C. As concentrações utilizadas foram 0,00294 g/ml de BQ, 0,00705 g/ml de EBQ e 0,00123 g/ml de MBQ. O cálculo foi efetuado para a emissão de benzoquinonas (totais e parciais) para 60 insetos, segundo El-Desouky *et al.* (2018). O método utilizado foi adaptado de Santos *et al.* (2016).

Após as duas repicagens de cada cultura bacteriana realizou-se uma suspensão das bactérias pretendidas em 10 ml de meio de *Müller-Hinton* (Biokar, França), padronizando-se sempre com o número 0,5 da escala de McFarland, que representa uma ordem de grandeza de 10⁵ UFC/ml. Para controlo e confirmação de UFC/ml da suspensão bacteriana procedeu-se a diluições decimais até 10⁵, onde se inoculou em placas de petri com meio de Agar de Soja Trípico (TSA) 100 µl da diluição 10⁻⁴ e 10⁻⁵ e posteriormente homogeneizado pela superfície do meio com esferas de vidro. Os ensaios foram efetuados numa microplaca (*Orange Scientific*, Bélgica) de 96 poços.

O primeiro passo consistiu em distribuir 50 µL de meio *Müller-Hinton* do 2º poço ao 11º poço sendo que no 12º poço pipetou-se 10 µl deste meio. Na primeira coluna foi colocado 100 µl de concentração máxima da amostra, seguidamente realizaram-se nove diluições sucessivas, retirando 50 µl de um poço e diluindo-o de 1:2 no poço seguinte. Este procedimento foi realizado desde o 2º ao 10º poço, sendo que no fim, no 10º poço, desprezou-se 50 µl da amostra para que este ficasse com o mesmo volume que os restantes. De seguida, procedeu-se à distribuição de 50 µl de suspensão bacteriana desde o 2º ao 11º poço. O 11º poço corresponde ao controlo positivo de crescimento com 50 µl de meio de *Müller-Hinton* mais 50 µl de suspensão bacteriana e o 12º poço, por sua vez, corresponde ao controlo negativo de crescimento (controlo de esterilidade) com 100 µl de meio *Müller-Hinton*.

Colocou-se a microplaca devidamente identificada numa estufa de incubação à temperatura de 37 °C e após 24 h observou-se a olho nu o crescimento bacteriano em cada poço.

2.4.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados obtidos da avaliação da atividade fungicida e fungostática da benzoquinona foi efetuada com o programa *RStudio* 1.2 (versão para *Windows* 7+ (64-bit)) foi efetuado o teste de *Kruskal-Wallis* para dados não paramétricos, uma vez que os dados não reuniram as condições de normalidade (avaliada através do teste de *Shapiro-Wilk*) e homocedasticidade (avaliada através do teste de *Bartlett*) necessárias para realizar uma análise paramétrica. No caso de o resultado do teste ser significativo (para $\alpha < 0,05$), rejeitando a hipótese nula, realizou-se o teste de *Wilcoxon* para comparação dos valores médios de amostras emparelhadas. Utilizaram-se as seguintes hipóteses de teste:

H₀: Não existem diferenças significativas entre as amostras

H₁: Existem diferenças significativas entre as amostras

De modo a evidenciar as diferenças entre os diversos tratamentos foi também calculado a “Avaliação do crescimento radial” (Medina-Córdova *et al.*, 2016; Ho *et al.*, 2015; Chohan *et al.*, 2011; Eksteen *et al.*, 2001).

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA MICBIOTA EM GRÃOS DE MILHO

Os grãos de milho foram analisados quanto à sua micobiota. Foram analisados 100 grãos de milho inteiros e identificados 68 fungos nos grãos em meio de PDA e 103 fungos nos grãos em papel de filtro. Em meio de PDA foram identificadas três espécies de fungos e em papel de filtro foram identificadas seis espécies de fungos. A **figura 7** mostra um exemplo das caixas de Petri analisadas.

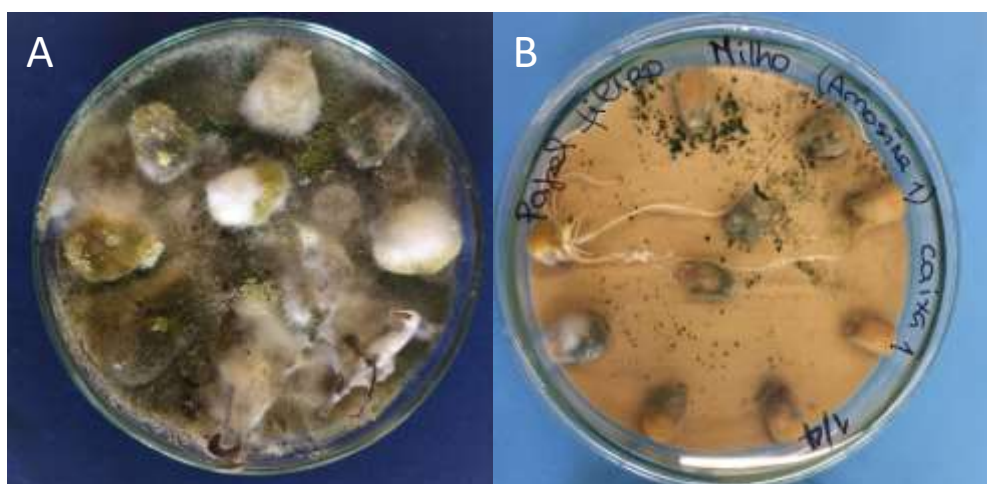


Figura 7- Caracterização da micobiota: Caixa de Petri com meio PDA (A) e caixa de Petri com papel de filtro (B)

Em todas as amostras existe uma frequência elevada de fungos de campo em comparação aos fungos de armazenamento. Estes resultados devem-se ao facto da amostra utilizada não ter sido armazenada e assim não ter havido a transição dos fungos de campo para os fungos de armazenamento. Os fungos identificados nos grãos de milho em meio PDA e em papel de filtro encontram-se no **quadro 3**.

De acordo com Poonyth, Hyde, & Peerally (2001) e Magro (2009), as espécies podem ser qualificadas como “Muito frequentes” (>20%), “Frequentes” (10-20%) e “Infrequentes” (<10%).

No meio de cultura PDA e com o papel de filtro as espécies de fungos mais frequentes (**quadros 4 e 5**) foram dois fungos de campo, *Penicillium purpurogenum* e *Trichoderma* sp. *P. purpurogenum* é um fungo que degrada as paredes celulares das plantas pela ação conjunta de 28 enzimas celulolíticas, xilanolíticas e pectinolíticas (Morales-Quintana *et al.*, 2017). É um xerófilo marginal conhecido pela deterioração do abacaxi na Índia, peras e frutas e em diversos alimentos como o milho, arroz, trigo, cevada, amendoim, soja e feijão (Pitt & Hocking, 2009). Os fungos pertencentes ao género *Trichoderma* são geralmente considerados fungos de campo, podendo incluir simbioses com plantas e fungos patogénicos e alguns são patogénicos para os humanos (Pitt & Hocking, 2009).

Quadro 3- Frequências absoluta e relativa (%) das espécies de fungos identificados nos grãos de milho em meio PDA e em papel de filtro

	Fungo	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)	Total de indivíduos
PDA	<i>P. purpurogenum</i>	0,27	26,5	68
	<i>Rhizopus</i> sp.	0,06	5,9	
	<i>Trichoderma</i> sp.	0,68	67,6	
Papel de filtro	<i>Fusarium</i> sp.	0,11	10,7	103
	<i>Alternaria</i> sp.	0,01	1,0	
	<i>A. flavus</i>	0,03	2,9	
	<i>P. purpurogenum</i>	0,38	37,9	
	<i>Rhizopus</i> sp.	0,11	10,7	
	<i>Trichoderma</i> sp.	0,37	36,9	

Quadro 4- Qualificação das espécies de fungos, segundo Poonyth *et al.*, (2001) e Magro (2009), relativamente à sua frequência em meio PDA

PDA		
Muito frequentes (> 20%)	Frequentes (10-20%)	Infrequentes (<10%)
<i>P. purpurogenum</i> (26,5%)		<i>Rhizopus</i> sp.(5,9%)
<i>Trichoderma</i> sp. (67,6%)		

Quadro 5- Qualificação das espécies de fungos, segundo Poonyth *et al.*, (2001) e Magro (2009), relativamente à sua frequência em papel de filtro

Papel de filtro		
Muito frequentes (>20%)	Frequentes (10-20%)	Infrequentes (<10%)
<i>P. purpurogenum</i> (37,9%)	<i>Fusarium</i> sp. (10,7%)	<i>A. flavus</i> (2,9%)
<i>Trichoderma</i> sp. (36,9%)	<i>Rhizopus</i> sp. (10,7%)	<i>Alternaria</i> sp. (1,0%)

3.2. CARACTERIZAÇÃO DA MICOBIOTA EM FARINHA DE MILHO

Em todas as amostras, controlo e respetivos ensaios 1 (E1- mantiveram-se os insetos) e 2 (E2- Retiraram-se os insetos), houve desenvolvimento de *A. flavus*, *A. niger*, *P. purpurogenum* e *Trichoderma* sp.. A presença de *F. oxysporum* e de *Rhizopus* sp. dá-se em todas as amostras com exceção: (a) da amostra com 60 insetos do ensaio 1 para o *F. oxysporum* (b) da amostra com 60 insetos do ensaio 1 para *Rhizopus* sp. (c) e da amostra com 20 insetos do ensaio 2 para o *Rhizopus* sp. (**fig. 8**

e quadro 6). Num ecossistema de armazenamento, o movimento constante das populações de insetos contribui para a dispersão de esporos viáveis de fungos, incluindo espécies de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. que são transportados pela superfície do corpo dos insetos (Nesci *et al.*, 2011).

A presença ou ausência de insetos nas amostras dos ensaios pareceu não influenciar o crescimento fúngico ou ter efeito fungicida nos fungos identificados. O crescimento fúngico nas farinhas de milho está relacionado com as inadequadas condições de armazenamento. O teor de água das farinhas não deve ultrapassar 14 % de teor de água, a fim de evitar o crescimento de fungos. No caso das farinhas de milho, 12 % de água é o nível crítico, abaixo do qual não ocorrerá crescimento microbiano (ICMSF, 2005). Nos nossos ensaios, o teor de água foi superior a 12 % em todas as amostras (**quadro 7**).

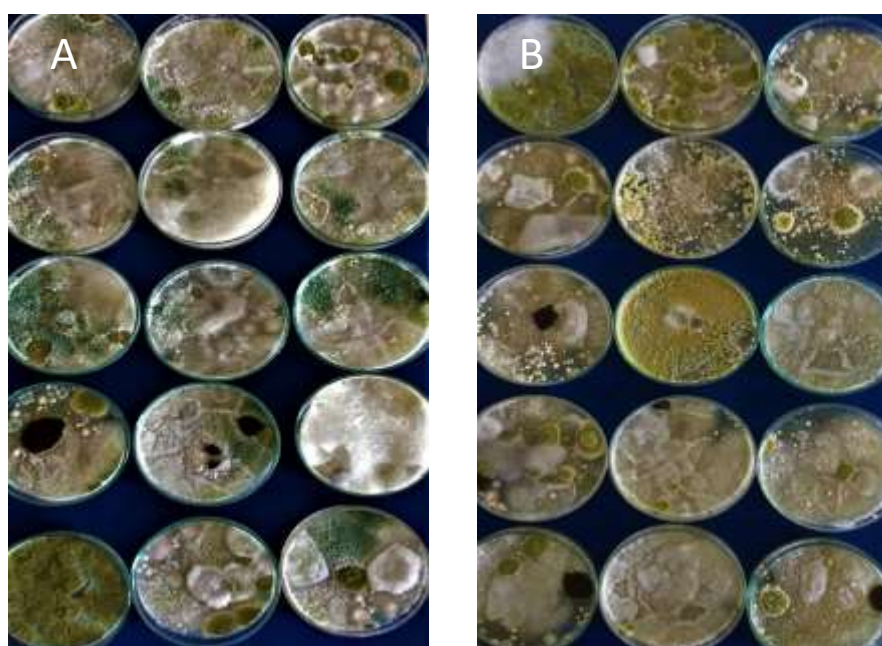


Figura 8- Caracterização da micobiota nos diferentes ensaios. Fungos presentes no ensaio 1 (mantiveram-se os insetos nas farinhas durante 52 dias) (A) e no ensaio 2 (retiraram-se os insetos ao fim de 40 dias, mantendo as farinhas sem insetos até 52 dias) (B) em meio de PDA (*potato dextrose agar*)

Quadro 6- Identificação de fungos nas diferentes amostras testadas (Ensaio 1- mantiveram-se os insetos; Ensaio 2- retiraram-se os insetos após 40 dias; 20 TCT- 20 insetos; 40 TCT- 40 insetos; 60 TCT- 60 insetos). Círculo azul significa a presença da espécie de fungo em questão.

Fungo	Controlo	Ensaio 1			Ensaio 2		
		20 TCT	40 TCT	60 TCT	20 TCT	40 TCT	60 TCT
<i>A. flavus</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>A. niger</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>F. oxysporum</i>	●	●	●		●	●	●
<i>Geotrichum</i> sp.						●	
<i>P. purpurogenum</i>	●	●	●	●	●	●	●
<i>Rhizopus</i> sp.	●	●	●			●	●
<i>Trichoderma</i> sp.	●	●	●	●	●	●	●

Quadro 7- Teores de água (%) das amostras testadas (Ensaio 1- mantiveram-se os insetos; Ensaio 2- retiraram-se os insetos após 40 dias; 20 TCT- 20 insetos; 40 TCT- 40 insetos; 60 TCT- 60 insetos)

	Teor de água (%)
Controlo	13,23
E1 – 20TCT	13,45
E1 – 40TCT	13,45
E1 – 60TCT	13,33
E2 – 20TCT	14,13
E2 – 40TCT	14,20
E2 – 60TCT	13,92

3.3. DETERMINAÇÃO DAS MICOTOXINAS

De acordo com as condições do método utilizado os valores das seis amostras analisadas foram inferiores ao LOD - limite de detecção (LOD aflatoxinas = 0,02µg/Kg; LOD ocratoxina A = 0,07 µg/Kg) logo são consideradas negativas para as toxinas analisadas e nas condições descritas (**quadro 8**). Os fungos produzem micotoxinas em resposta ao stress causado por condições ambientais extremas, escassez de alimento ou competição com outros microrganismos (Benbrook, 2005). No nosso caso, os fungos que foram isolados e que podiam produzir aflatoxinas e ocratoxinas A são o *A. flavus* e o *A. niger*. *Aspergillus flavus* é ubíquo e adapta-se a uma variedade de climas, habitats e substratos, no entanto, só 40 % das estirpes são micotoxigénicas (Frisvad, Thrane, Samson, & Pitt, 2006). *Aspergillus niger* produz OTA em pequenas quantidades apesar de ser ubíquo e muito comum em alimentos, só uma pequena percentagem das estirpes é produtora de micotoxinas (Frisvad *et al.*, 2006). O facto de os resultados de detecção de micotoxinas obtidos terem sido inferiores ao LOD pode dever-se ao facto de as estirpes utilizadas não serem micotoxigénicas, ou de as condições ambientais não serem as mais favoráveis à produção de micotoxinas.

A temperatura e o teor de água do alimento são os fatores mais importantes para o crescimento de fungos e a produção de micotoxinas. As aflatoxinas desenvolvem-se a uma temperatura ótima de 33 °C e 0,99 de a_w ao passo que as ocratoxinas desenvolvem-se a temperaturas ótimas entre os 25-30 °C e 0,98 de a_w (Mannaa & Kim, 2017) (Milani, 2013). Nos ensaios realizados no âmbito deste trabalho, as amostras tinham, em média, a_w entre 0,61 e 0,70 (valores medidos no final dos ensaios) (**quadro 9**). A temperatura das amostras até a detecção de micotoxinas variou entre 27±1 °C e 30±1 °C. Estas diferenças, nomeadamente ao nível da água disponível, podem constituir uma explicação para o facto de os resultados obtidos serem inferiores ao LOD.

As condições ótimas para o desenvolvimento de micotoxinas e os requisitos eco-fisiológicos para a produção de micotoxinas por parte dos fungos podem ser mais restritos do que aqueles necessários ao crescimento fúngico (Soares *et al.*, 2013). As aflatoxinas podem contaminar os alimentos em

condições particulares: tempo seco próximo de maturidade da colheita; elevado teor de água durante a colheita e secagem e armazenamento inadequados (PACA, 2012). As ocratoxinas são produzidas em condições de armazenamento que favorecem o crescimento de fungos e a produção de toxinas (Richard, 2007).

Quadro 8- Resultados da determinação das micotoxinas em farinha de milho (AFB1: Aflatoxina B1; AFB2: Aflatoxina B2; AFG1: Aflatoxina G1; AFG2: Aflatoxina G2; AFM1: Aflatoxina M1; OTA: Ocratoxina A) nos ensaios E1 (Mantiveram-se os insetos) e E2 (Retiraram-se os insetos).

Amostra	AFB ₁	AFB ₂	AFG ₁	AFG ₂	OTA
Controlo	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
E1 – 20TCT	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
E1 – 40TCT	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
E1 – 60TCT	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
E2 – 20TCT	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
E2 – 40TCT	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
E2 – 60TCT	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD

LOD (µg/kg) AFT=0,02; LOD (µg/kg) OTA=0,07

Quadro 9- Valores de a_w das amostras analisadas no final do ensaio

	Repetição 1	Repetição 2	Repetição 3	Média
Controlo	0,65	0,56	0,65	0,62
E1 – 20TCT	0,63	0,60	0,61	0,61
E1 – 40TCT	0,65	0,66	0,64	0,65
E1 – 60TCT	0,66	0,64	0,61	0,63
E2 – 20TCT	0,70	0,70	0,69	0,70
E2 – 40TCT	0,69	0,69	0,67	0,68
E2 – 60TCT	0,63	0,65	0,67	0,65

3.4. REDUÇÃO DE MASSA DA FARINHA DE MILHO CAUSADA PELO DESENVOLVIMENTO DO *TRIBOLIUM CASTANEUM*

A análise da redução de massa da farinha causada pelo desenvolvimento do *T. castaneum*, durante 40 dias, foi efetuada para três tratamentos: 20 insetos, 40 insetos e 60 insetos. A massa inicial para cada repetição de cada tratamento foi de 20 g. Em todas as repetições não houve mortalidade associada. A **figura 9** mostra a redução de massa, em percentagem, causada pelo desenvolvimento dos insetos.

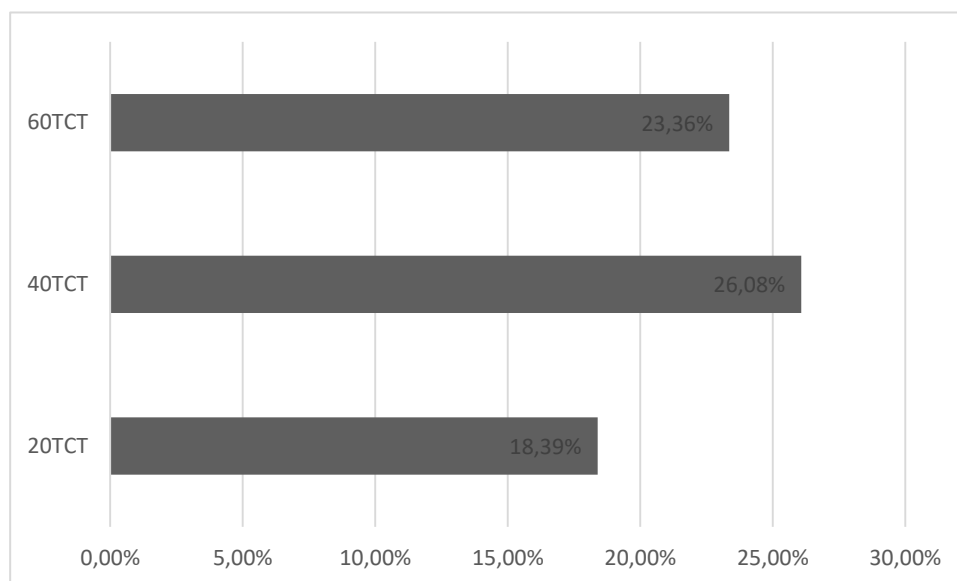


Figura 9- Redução de massa (%) da farinha de milho, causada pelo desenvolvimento dos insetos (TCT- *T. castaneum*)

O tratamento com 20 insetos teve uma percentagem de perda de massa menor (18,39 %) do que os outros dois tratamentos efetuados, 40 insetos (26,08 %) e 60 insetos (23,36 %). É de notar que para o tratamento de 40 insetos a perda de massa foi maior que para o tratamento de 60 insetos.

Estes valores podem ser explicados pela quantidade de alimento para a proporção de indivíduos. É importante assegurar a descendência e se não existir alimento suficiente a taxa de crescimento populacional pode diminuir, como no caso do tratamento de 60 insetos, pois a competição será maior. O número de descendentes de uma fêmea pode ser considerado consequência final do desempenho da própria (Da Silva Belchol *et al.*, 2017), assim uma percentagem consideravelmente superior de fêmeas do que de machos pode ser uma hipótese para explicar a maior quantidade média de larvas (1,08 g) para os ensaios com 40 insetos em comparação aos ensaios com 20 insetos (0,86 g) e 60 insetos (0,66 g). No entanto, não foi contabilizado o número de fêmeas neste ensaio. A ocorrência desta diferença pode ainda dever-se ao facto de ter existido canibalismo devido à escassez de alimento e de sobre povoamento dos habitats (Barros, 2007).

3.5. INTERAÇÃO ENTRE O INSETO ADULTO E OS FUNGOS, EM FARINHA DE MILHO

A interação entre o inseto adulto e os fungos foi observada através de duas metodologias diferentes, no entanto, conclui-se que, independentemente do método utilizado, os resultados observados foram similares. No ensaio controlo não há transporte dos esporos pelos insetos como existe nos tratamentos efetuados com insetos (20 insetos, 40 insetos e 60 insetos). A atividade prolongada de *T. castaneum* gera maior humidade no ambiente, o que pode promover uma maior atividade microbiana (Kumari *et al.*, 2011). Nos ensaios com insetos, o desenvolvimento dos fungos foi superior, devido ao movimento dos insetos e ao transporte de esporos. Os insetos foram colonizados maioritariamente pelo fungo *A. flavus* (Fig. 9). Este resultado está de acordo com outro estudo no qual farinha com insetos (*T.*

castaneum) tem uma maior quantidade de fungos (*A. flavus* e *A. parasiticus*), comparativamente a farinha sem a presença de insetos (Allotey *et al.*, 2001). No decorrer dos ensaios observou-se uma taxa de mortalidade elevada e instantânea, com o crescimento do fungo sobre os insetos adultos. É de realçar que este fenómeno já tinha previamente sido reportado para outra espécie de fungo, *B. bassiana*, no qual a produção de enzimas e hifas penetrantes resultou no crescimento do fungo através do exoesqueleto de *T. castaneum*, sendo um fungo utilizado em luta biológica contra pragas de insetos (Pedrini *et al.*, 2015).



Figura 9- Colonização do inseto por parte de um fungo, ao terceiro dia de ensaio.

3.6. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FUNGICIDA E FUNGISTÁTICA DA 1,4 – BENZOQUINONA

3.6.1. *Aspergillus flavus*

A análise estatística efetuada com os dados referentes a *A. flavus* mostrou a não rejeição da hipótese nula ($K=5.21$; $p=0,39$), face ao nível de significância de $\alpha<0,05$, apesar da heterogeneidade dos resultados obtidos (**fig. 11**), pois através de observação visual, no final do ensaio, verificou-se uma taxa de crescimento claramente inferior, pelo menos nos ensaios com metanol (solvente e com BQ). Este resultado pode dever-se ao facto de não ter sido possível recolher as medições de crescimento do fungo diariamente em todas as amostras, pois isto faz-se através da medição do diâmetro dos fungos, e isto nem sempre é possível, pois há libertação dos conídios, através dos movimentos da caixa de

Petri, havendo a formação de várias colônias e não apenas uma. A **figura 10** demonstra as características morfológicas das colônias no final dos ensaios.

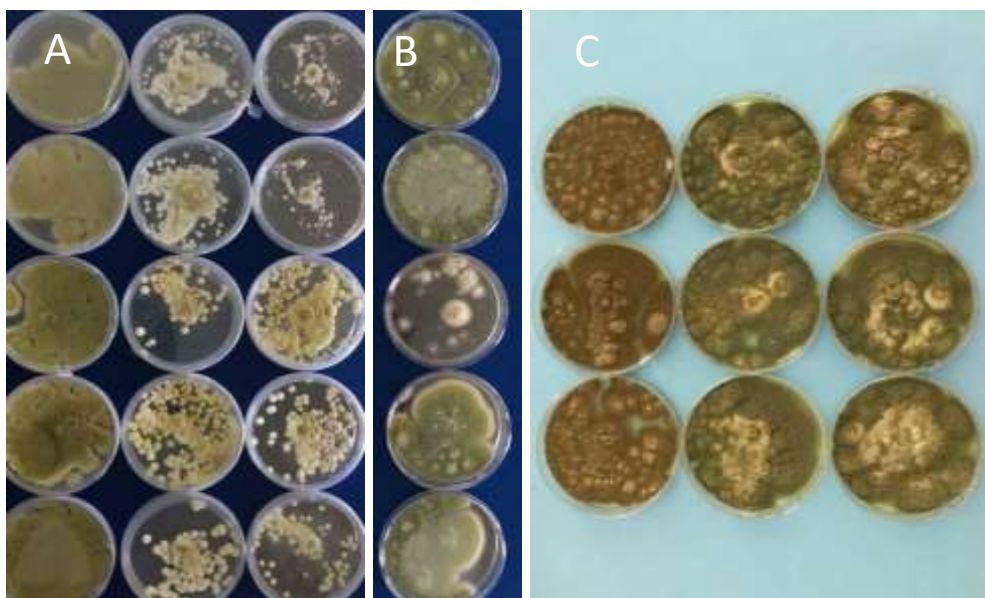


Figura 10- (A) Ensaio do *Aspergillus flavus* utilizando o metanol como solvente; (B) *Aspergillus flavus* utilizando a água como solvente e (C) *Aspergillus flavus* utilizando etanol como solvente.

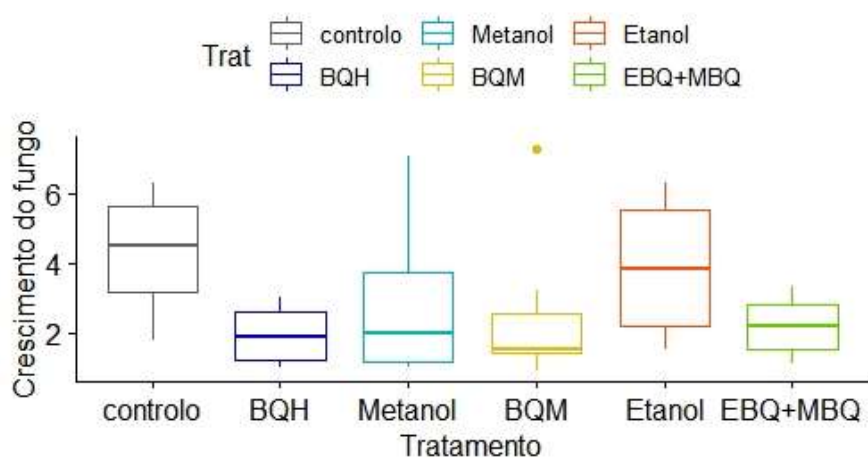


Figura 11- Comparação do crescimento do fungo *Aspergillus flavus* quando submetido aos diversos tratamentos (Trat - controle; BQH – Benzoquinona diluída em água SDW; BQM: Benzoquinona diluída em metanol; EBQ+MBQ: mistura de etil – 1,4- benzoquinona + metil – 1,4- benzoquinona)

Avaliação do crescimento radial

As medições de *A. flavus* no ensaio do metanol só foram possíveis em dois dias dos sete dias de medições previstos. No entanto, é possível constatar que no primeiro dia o fungo cresceu (33,7 %) mais em comparação ao fungo em metanol (21,7 %). No entanto, o fungo em BQ cresceu mais do que o fungo em metanol (-18,2 %).

As medições do *A. flavus* em água (SDW) foram possíveis até ao dia seis, de sete dias previstos. Em todos os dias o fungo em BQ cresceu menos que o controlo.

O crescimento radial do *A. flavus* com o solvente etanol mostrou que entre o fungo no ensaio de controlo, o controlo cresceu 54,7 % mais do que o fungo em EBQ+MBQ no primeiro dia, sendo esse valor de 53,4 % no segundo dia e 39,1 % no terceiro dia. No entanto, as diferenças de crescimento entre o fungo em ensaio controlo e o fungo em etanol foram de 10,5 % no primeiro dia, 40,2 % no segundo dia e 22,5 % no terceiro dia. Em relação ao fungo em contacto com solvente (etanol) e o fungo em EBQ+MBQ, os crescimentos no solvente foram superiores, com valores de 49,4 % de crescimento relativamente aos fungos em EBQ+MBQ no primeiro dia, 22,1 % no segundo dia e 21,5 % no terceiro dia.

O **quadro 10** mostra os resultados, em percentagem, da avaliação do crescimento radial do fungo *A. flavus* durante os sete dias.

Quadro 10- Avaliação do crescimento radial do fungo *Aspergillus flavus* (%) durante sete dias

	1	2	3	4	5	6	7
Controlo e Metanol	33,7	23,8					
Controlo e BQ	21,7	43,9					
Metanol e BQ	-18,2	26,4					
Controlo e Etanol	10,5	40,2	22,5	39			0
Controlo e EBQ+MBQ	54,7	53,4	39,1				0
Etanol e EBQ+MBQ	49,4	22,1	21,5				0
Controlo e BQ (ensaio com água destilada esterilizada)	30,6	30,4	26,9	39,1	24,3	25	

3.6.2. *Aspergillus niger*

A análise estatística efetuada com os dados referentes a *A. niger* mostrou a não rejeição da hipótese nula ($K=3,24$; $p=0,6634$), face ao nível de significância de $\alpha<0,05$. A **figura 13** mostra as diferenças entre os diferentes tratamentos efetuados. Este resultado pode dever-se ao facto de termos amostras pequenas, com poucos dias de medições. A obtenção das medições dos diâmetros deste fungo nem sempre é possível porque há uma dificuldade em manter as colónias, visto que há libertação dos conídios com os movimentos da caixa de Petri (**fig. 12**).

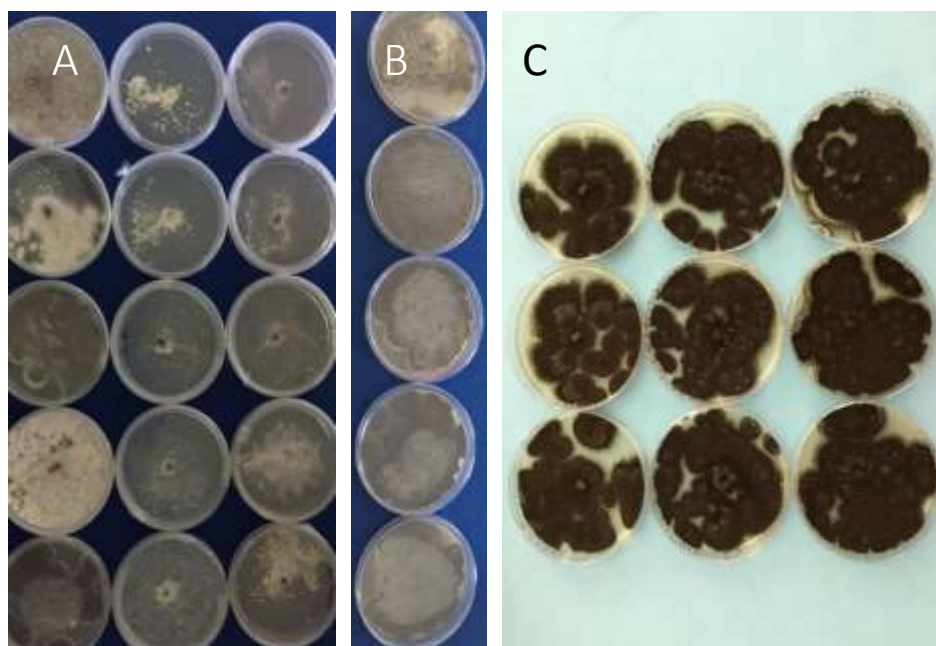


Figura 12- (A) Ensaio do *Aspergillus niger* utilizando o metanol como solvente; (B) *Aspergillus niger* utilizando a água como solvente e (C) *Aspergillus niger* utilizando etanol como solvente

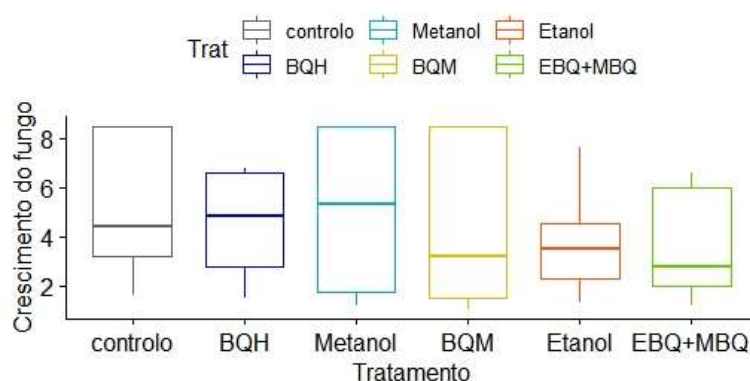


Figura 13- Comparação do crescimento do fungo *Aspergillus niger* quando submetido aos diversos tratamentos (Trat - controle; BQH – Benzoquinona diluída em água SDW; BQM: Benzoquinona diluída em metanol; EBQ+MBQ: mistura de etil – 1,4- benzoquinona + metil – 1,4 – benzoquinona diluídas em etanol)

Avaliação do crescimento radial

Para o solvente metanol foram obtidas medições durante dois dias dos sete dias previstos. No primeiro dia, o fungo do ensaio controle cresceu mais em comparação ao fungo em BQ (32,3 %) do que em comparação ao fungo em metanol (22,3 %). No entanto, o fungo em metanol cresceu 6,9 % em comparação ao fungo em BQ. No segundo dia de medições, a situação inverteu-se sendo o crescimento maior do controle em comparação ao fungo em metanol do que em comparação ao fungo em BQ. A relação entre o fungo em metanol e o fungo em BQ é negativa no segundo dia, sendo que o fungo em BQ cresceu 86,2 % em comparação ao fungo em metanol.

A avaliação do crescimento radial utilizando a água (SDW) como solvente para a BQ foi medida em três dias consecutivos e no quinto dia sendo que no primeiro dia o fungo do ensaio controle cresceu

mais 11,4 % em comparação ao fungo exposto a BQ, e nos restantes dias inverteu-se a situação sendo o crescimento negativo, ou seja, o fungo em BQ cresceu mais do que o fungo controlo.

A avaliação do crescimento radial do *A. niger* utilizando o etanol como solvente demonstrou que o fungo dos ensaios controlo obteve valores de crescimento superiores, relativamente ao fungo exposto a etanol. Em relação ao fungo do ensaio controlo, verificou-se um crescimento superior ao do fungo exposto a EBQ+MBQ. O fungo exposto a etanol e o fungo exposto a EBQ+MBQ diluídos em etanol apresentaram resultados variáveis nos dias medidos.

O **quadro 11** mostra os resultados, em percentagem, da avaliação do crescimento radial do fungo *A. niger* durante sete dias.

Quadro 11- Avaliação do crescimento radial (%) do fungo *Aspergillus niger* durante sete dias

	1	2	3	4	5	6	7
Controlo e Metanol	22,3	50,5			0	0	0
Controlo e BQ	32,3	7,9					0
Metanol e 1,4-Benzoquinona	6,9	-86,2					0
Controlo e Etanol	48,4	32,5	35,4	36,7	27,7		10,1
Controlo e EBQ+MBQ	53,9	33,3	26,3	37,6			0
Etanol e EBQ+MBQ	10,6	1,2	-14,1	1,4		-13,2	-11,2
Controlo e BQ (ensaio com água destilada esterilizada)	11,4	-23,1	-84		-37,4		

3.6.3. *Fusarium oxysporum*

O teste demonstra claramente que existem diferenças significativas entre os dados analisados ($K=45,793$ e $p<0,001$) (**quadro 12 e fig. 15**).

Em relação ao controlo existem diferenças significativas entre este e o metanol, e a BQM, bem como relativamente ao etanol e EBQ+MBQ. No entanto, a diferença significativa entre o controlo e a benzoquinona dissolvida em metanol poderá ser causada pelo efeito do solvente pois não se verificaram diferenças significativas entre o crescimento dos fungos em contacto com metanol e em contacto com a BQ dissolvida em metanol. Outras diferenças significativas interessantes são entre o controlo e o etanol e entre o controlo e a EBQ+MBQ. No entanto, as diferenças que são significativas poderão ser causadas mais uma vez pelo efeito do solvente pois não se verificaram diferenças significativas entre o crescimento dos fungos em contacto com o etanol e em contacto com a EBQ+MBQ dissolvida em etanol. Não existem diferenças significativas entre o controlo e a BQ em água, logo o efeito fungicida ou fungistático destes dois compostos (BQ e EBQ+MBQ) não se verificou no fungo *F. oxysporum*, para as condições utilizadas neste ensaio. A **figura 14** demonstra as características morfológicas das colónias nos ensaios realizados.

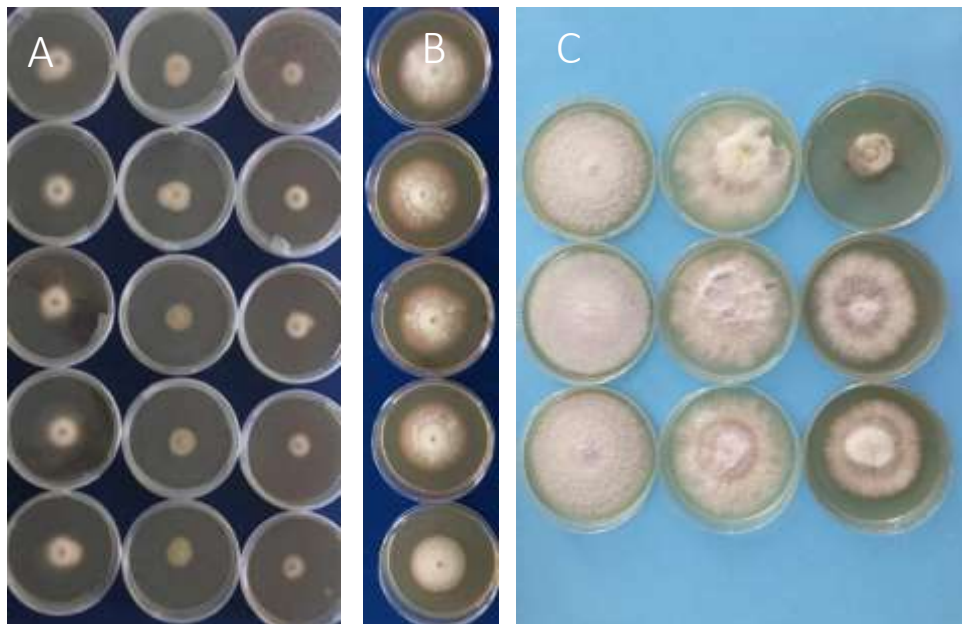


Figura 14- (A) Ensaio do *Fusarium oxysporum* utilizando o metanol como solvente; (B) *Fusarium oxysporum* utilizando a água como solvente e (C) *Fusarium oxysporum* utilizando etanol como solvente

Quadro 12- Análise estatística do *Fusarium oxysporum* (BQH: Benzoquinona dissolvida em água (SDW) BQM: Benzoquinona dissolvida em metanol; Controlo; EBQ+MBQ: etil-1,4-benzoquinona+metil-1,4-benzoquinona; Etanol; Metanol)

	BQH	BQM	Controlo	EBQ+MBQ	Etanol
BQM	0.00906	-	-	-	-
Controlo	0.46062	0.00068	-	-	-
EBQ+MBQ	0.00068	0.00741	2.9e-05	-	-
Etanol	0.00415	0.19295	0.00066	0.17156	-
Metanol	0.03719	0.29941	0.00323	0.00323	0.03941

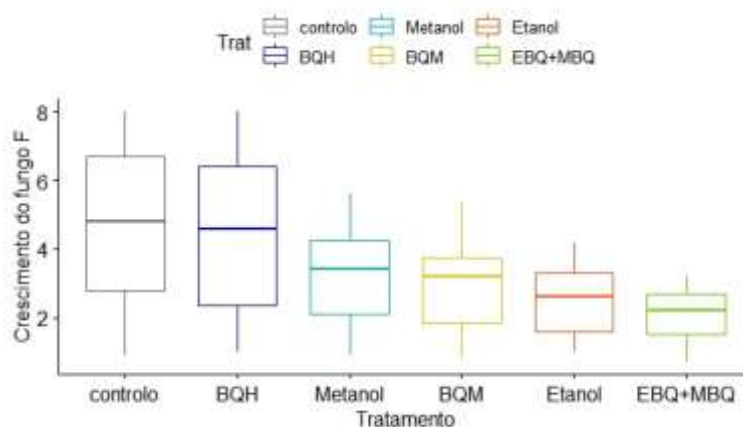


Figura 15- Comparação do crescimento do fungo *Fusarium oxysporum* quando submetido aos diversos tratamentos (Trat - controlo; BQH – Benzoquinona diluída em água SDW; Metanol: Benzoquinona diluída em metanol; EBQ+MBQ: mistura de etil – 1,4- benzoquinona + metil – 1,4 – benzoquinona diluídas em etanol)

Avaliação do crescimento radial

O crescimento radial do *F. oxysporum* utilizando o solvente metanol demonstrou que existem maiores diferenças entre o fungo controlo e o fungo em BQ em todos os dias avaliados. Em relação ao controlo e ao metanol, no primeiro dia de medição o controlo cresceu 3,8 % em comparação com o metanol sendo que o crescimento radial entre o fungo em metanol e o fungo em BQ foi de 16,0 %. Nos outros dias de medição, os resultados inverteram-se sendo que as diferenças entre o controlo e o fungo em metanol foram superiores às diferenças entre o crescimento do fungo em metanol e do fungo em BQ.

O crescimento radial do *F. oxysporum* utilizando a água (SDW) como solvente mostrou que nos sete dias avaliados, o fungo controlo cresceu mais do que o fungo em BQ.

O crescimento radial do *F. oxysporum* utilizando o etanol como solvente demonstrou ao longo dos sete dias de medições que as diferenças entre o fungo controlo e o fungo em EBQ+MBQ são superiores às diferenças entre o controlo e o fungo em etanol, ou seja o fungo controlo cresceu mais em comparação ao fungo em EBQ+MBQ do que o fungo em etanol. Por outro lado, as diferenças entre o fungo em etanol e o fungo em EBQ+MBQ são menores, no entanto o fungo e etanol cresce mais do que o fungo em EBQ+MBQ.

O **quadro 13** mostra os resultados, em percentagem, da avaliação do crescimento radial do fungo *F. oxysporum* durante sete dias.

Quadro 13- Avaliação do crescimento radial do fungo *Fusarium oxysporum* (%) durante sete dias

	1	2	3	4	5	6	7
Controlo e Metanol	3,8	13,7	20,5	27,5	28,6	33,7	35,9
Controlo e BQ	19,2	22,2	27,5	30,9	32,9	40,8	40,8
Metanol e BQ	16,0	9,9	8,8	4,7	5,9	10,6	7,7
Controlo e Etanol	38,0	44,7	49,6	49,7	48,9	50,7	49,4
Controlo e EBQ+MBQ	46,0	49,4	57,5	57,1	58,9	60,4	60,4
Etanol e EBQ+MBQ	12,9	8,5	15,8	14,9	19,6	19,6	21,8
Controlo e BQ (ensaio com água destilada esterilizada)	15,7	13,2	6,3	5,4	8,5	5,2	3,3

3.6.4. *Penicillium purpurogenum*

A análise estatística efetuada com os dados referentes ao *P. purpurogenum* mostrou a não rejeição da hipótese nula ($K=5,79$; $p=0,2155$), face ao nível de significância de $\alpha<0,05$ (**Fig. 17**). Este resultado pode dever-se ao facto de termos amostras pequenas, com poucos dias de medições. A obtenção das medições dos diâmetros do *P. purpurogenum* nem sempre é possível porque há uma dificuldade em manter as colónias, visto que há libertação dos conídios com os movimentos da caixa de Petri. A **figura 16** mostra as características das colónias ao longo dos ensaios realizados.

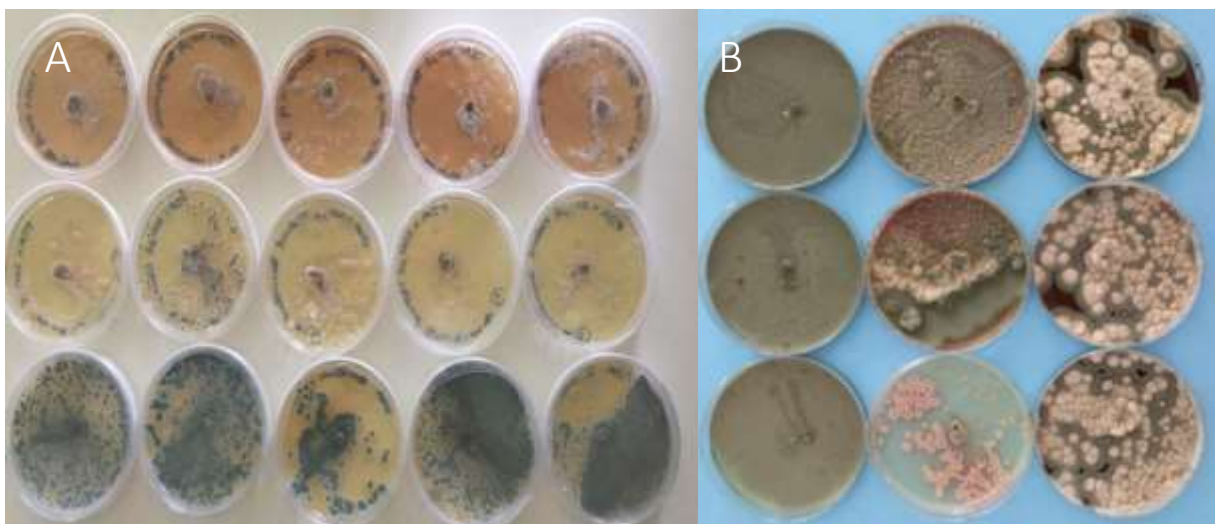


Figura 16- (A) Ensaio do *Penicillium purpurogenum* utilizando o metanol como solvente (primeira linha: fungo com BQ; segunda linha fungo com metanol; terceira linha: controle); (B) *Penicillium purpurogenum* utilizando etanol como solvente (controle à esquerda, fungo e etanol a meio e fungo e EBQ+MBQ à direita)

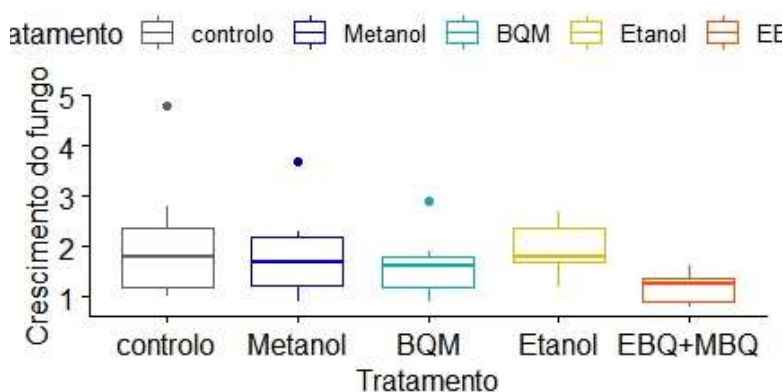


Figura 17- Comparação do crescimento do fungo *Penicillium purpurogenum* quando submetido aos diversos tratamentos (Trat - controle; BQH – Benzoquinona diluída em água SDW; BQM: Benzoquinona diluída em metanol; EBQ+MBQ: mistura de etil – 1,4- benzoquinona + metil – 1,4 – benzoquinona diluídas em etanol)

Avaliação do crescimento radial

O crescimento radial do *P. purpurogenum* no primeiro dia de medições mostrou que entre o fungo em ensaio controle cresceu 4,8 % em comparação ao fungo em metanol, e o mesmo valor foi verificado em comparação com o fungo em BQ. Entre o fungo em metanol e o fungo em BQ as diferenças foram 0 %. No segundo dia de medições, o controle cresceu 12,8 % em comparação ao fungo em metanol sendo a diferença de crescimento do fungo controle em relação ao fungo em BQ de 28,4 %. Em relação ao fungo em metanol e o fungo em BQ a diferença foi de 17,9 % no segundo dia.

O crescimento radial do *P. purpurogenum* no primeiro dia mostrou que entre o fungo controle e o fungo em etanol a diferença foi de 62,5 % e que entre o fungo controle e o fungo em EBQ+MBQ a diferença foi de 76,6 %. Entre o fungo em etanol e o fungo em EBQ+MBQ, o fungo em etanol cresceu mais em comparação ao fungo em EBQ+MBQ.

O **quadro 14** mostra os resultados, em percentagem, da avaliação do crescimento radial do fungo *P. purpurogenum* durante sete dias.

Quadro 14- Avaliação do crescimento radial do fungo *Penicillium purpurogenum* (%) durante sete dias

	1	2	3	4	5	6	7
Controlo e Metanol	4,8	12,8					
Controlo e BQ	4,8	28,4					
Metanol e BQ	0	17,9					
Controlo e Etanol	62,5						
Controlo e EBQ+MBQ	76,6						
Etanol e EBQ+MBQ	37,5	34,9					

3.6.5. *Trichoderma* sp.

O teste demonstra que existem diferenças significativas entre os dados analisados ($K=113,61$; $p<0,001$) (**quadro 15 e fig. 19**). Em relação ao controlo existem diferenças significativas entre este e o metanol e a benzoquinona dissolvida em metanol, bem como relativamente ao etanol e EBQ+MBQ. No entanto, a diferença significativa entre o controlo e a benzoquinona dissolvida em metanol poderá ser causada pelo efeito do solvente pois não se verificaram diferenças significativas entre o crescimento dos fungos em contacto com metanol e em contacto com a BQ dissolvida em metanol. Outras diferenças significativas interessantes são entre o controlo e o etanol e entre o controlo e a EBQ+MBQ. No entanto, as diferenças que são significativas poderão ser novamente atribuídas ao efeito do solvente pois não se verificaram diferenças significativas entre o crescimento dos fungos em contacto com o etanol e em contacto com a EBQ+MBQ dissolvida em etanol. Neste ensaio verificou-se que a BQ dissolvida em água teve um efeito fungicida ou fungistático sobre *Trichoderma* sp.. A **figura 18** mostra as características morfológicas das colónias no final dos ensaios.

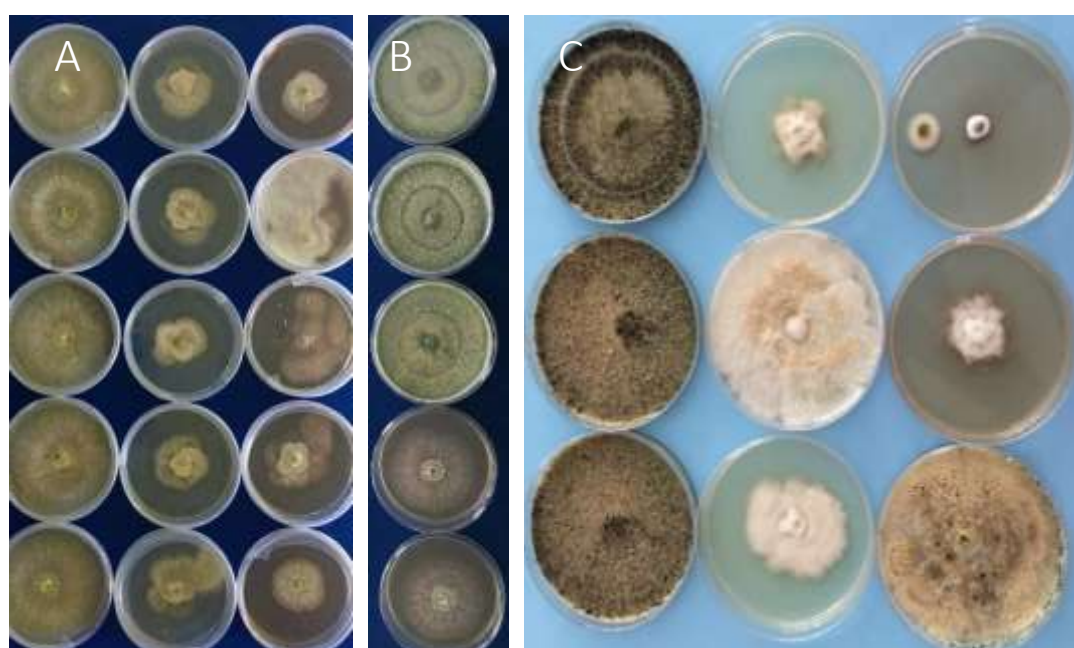


Figura 18- (A) Ensaio do *Trichoderma* sp. utilizando o metanol como solvente; (B) *Trichoderma* sp. utilizando a água como solvente e (C) *Trichoderma* sp. utilizando etanol como solvente

Quadro 15- Análise estatística do *Trichoderma* sp. (BQH: Benzoquinona dissolvida em água SDW; BQM: Benzoquinona dissolvida em metanol; Controlo; EBQ+MBQ: etil-1,4-benzoquinona+metil-1,4-benzoquinona; Etanol; Metanol)

	BQH	BQM	Controlo	EBQ+MBQ	Etanol
BQM	0.0014	-	-	-	-
Controlo	0.0104	5.7e-07	-	-	-
EBQ+MBQ	2.3e-08	1.3e-05	2.7e-12	-	-
Etanol	1.6e-08	3.3e-05	2.7e-12	0.6769	-
Metanol	0.0037	0.4666	4.7e-07	5.8e-07	1.1e-06

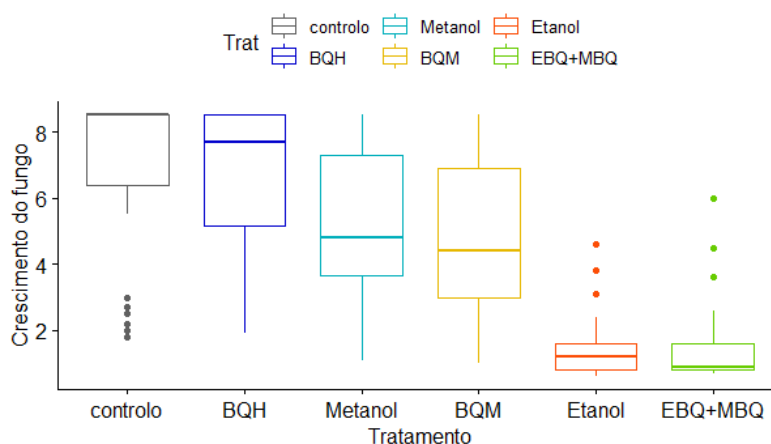


Figura 19- Comparação do crescimento do fungo *Trichoderma* sp. quando submetido aos diversos tratamentos (Trat - controlo; BQH – Benzoquinona diluída em água SDW; BQM: Benzoquinona diluída em metanol; EBQ+MBQ: mistura de etil – 1,4- benzoquinona + metil – 1,4 – benzoquinona diluídas em etanol)

Avaliação do crescimento radial

O crescimento radial do *Trichoderma* sp. foi avaliado durante sete dias. É de notar que as diferenças entre o fungo em metanol e o fungo em BQ são, maioritariamente, menores que as diferenças entre o fungo controlo e o fungo em metanol e entre o fungo controlo e a BQ. A diferença entre o fungo em metanol e o fungo em BQ é negativa em dois dias de avaliação (dia um e dia três), mostrando assim que nesses dias na presença da BQ o fungo cresce mais do que na presença de metanol. No entanto nos outros dias, o fungo em metanol cresce mais do que o fungo em BQ.

Em relação à utilização da água (SDW) como solvente, existem diferenças entre o controlo e o fungo em BQ. Nota-se, claramente que o fungo em BQ cresce menos que o fungo controlo até ao último dia de medições.

O crescimento radial do *Trichoderma* sp. ao longo dos sete dias de medições mostrou que existem diferenças entre o fungo controlo e o fungo em etanol e entre o fungo controlo e o fungo em EBQ+MBQ em comparação ao fungo em etanol e o fungo em EBQ+MBQ. Nos dias um, dois, três e sete o

crescimento é negativo entre o fungo em etanol e o fungo em EBQ+MBQ o que significa que o fungo em EBQ+MBQ cresceu mais do que o fungo em etanol.

O **quadro 16** mostra os resultados, em percentagem, da avaliação do crescimento radial do fungo *Trichoderma* sp. durante sete dias.

Quadro 16- Avaliação do crescimento radial do fungo *Trichoderma* sp. (%) durante sete dias

	1	2	3	4	5	6	7
Controlo e Metanol	40,2	48,1	49,4	33,4	22,1	14,6	9,6
Controlo e BQ	33,3	50,2	39,6	31,8	28,2	24,7	22,4
Metanol e BQ	-11,5	4,2	-19,4	-2,5	7,9	11,8	14,1
Controlo e Etanol	78,2	86,1	86,7	81,6	78,8	73,7	70,2
Controlo e EBQ+MBQ	72,4	83,7	85,9	83,1	79,2	75,7	67,5
Etanol e EBQ+MBQ	-26,3	-17,9	-5,9	8,5	1,9	7,5	-9,2
Controlo e BQ (ensaio com água destilada esterilizada)	13,9	11,4	17,6	8,7	8,7	2,1	0

Discussão dos resultados

Tribolium castaneum promove a multiplicação de alguns fungos (*A. flavus* e *A. parasiticus*) sendo portador dos seus esporos e micélio promovendo a sua disseminação. Alguns autores observaram também que o *A. flavus* e o *A. parasiticus* estão entre os fungos encontrados dentro do intestino do *T. castaneum* (Clerk & Badu-Yeboah, 1996). Um estudo sobre a micobiota da farinha de milho mostrou que na presença deste inseto, os fungos *A. flavus* e *A. parasiticus* aumentam consideravelmente em comparação à sua presença em farinha sem inseto (Allotey *et al.*, 2001).

Com base no que foi apresentado, estatisticamente, os resultados demonstram que a presença do inseto e a sua produção de BQ não interferem no crescimento do *A. flavus* e do *A. niger*. No entanto, as benzoquinonas tiveram efeitos negativos em alguns fungos.

Para o *F. oxysporum* e para o *Trichoderma* sp. as diferenças significativas existentes são atribuídas aos solventes orgânicos utilizados, metanol e etanol, sendo que no *F. oxysporum* não existem diferenças significativas utilizando o solvente água (SDW) e no *Trichoderma* sp. existem diferenças significativas no solvente água (SDW). A presença do metanol e do etanol como solvente para a determinação de atividade antifúngicas demonstraram ter um efeito sobre o fungo. Segundo Eloff *et al.* (2007), os fungos são relativamente sensíveis ao metanol e ao etanol, sendo que nos seus estudos relativamente à resistência dos fungos em ensaios biológicos, o etanol e o metanol foram tóxicos em concentrações de 16 %, em alguns fungos e quando estes solventes são usados na determinação de propriedades fungicidas de compostos, podem dar resultados positivos falsos. O etanol foi usado como fungicida ao longo do tempo (Dao & Dantigny, 2011). O facto de BQ interferir no crescimento do *Trichoderma* sp. e provocar um atraso no crescimento, ao longo do tempo, pode indicar que a BQ dissolvida em água tem propriedades fungicidas. Esta benzoquinona em água poderá eventualmente

transformar-se numa hidroquinona (HQ). A hidroquinona (HQ) é um composto fenólico de origem natural ou antropogénica, encontrada em grandes concentrações no cigarro, além de ser produto da biotransformação do benzeno (Shimada, 2011). As quinonas e seus produtos de redução (semiquinonas e hidroquinonas) são de interesse toxicológico pois podem causar danos em membranas, proteínas e no ADN, podendo induzir a apoptose e, entre outros, a carcinogénese (Valderrama *et al.*, 2008).

Os resultados da avaliação do crescimento radial nos fungos *P. purpurogenum* e *F. oxysporum*, expostos a EBQ+MBQ demonstraram um crescimento inferior ao crescimento que obtiveram quando expostos apenas ao solvente associado (etanol), apesar de estatisticamente esta diferença não ter sido considerada significativa, o efeito referido era visível no final dos ensaios, como já foi referido anteriormente, pois, por exemplo, verificou-se um atraso na esporulação do *P. purpurogenum*. A exposição do fungo *B. bassiana* a BQ pode provocar atrasos na sua germinação, em resposta à benzoquinona, o fungo tem capacidade de produzir uma benzoquinona redutase que é uma enzima amplamente distribuída nos fungos (Pedrini *et al.* (2015)), o que demonstra que existe a capacidade de resposta por parte dos fungos à exposição a uma substância excretada por um inseto que pode interferir negativamente com o seu crescimento.

Como os dados obtidos têm algumas limitações, a interpretação dos resultados associados ao *A. flavus*, *A. niger* ao *P. purpurogenum* deverá ser feita com cuidado. No entanto, ressalva-se o carácter exploratório deste estudo, que foi o primeiro a avaliar o efeito de benzoquinonas libertadas por *T. castaneum* no crescimento de fungos associados à farinha de milho. Seria importante tentar encontrar solventes alternativos que tenham menor influência no crescimento dos fungos, embora seja difícil devido às propriedades químicas das benzoquinonas. Por exemplo, Eloff *et al.* (2007) afirmaram que a acetona devido à sua grande variedade de polaridades, é um dos solventes menos tóxicos para os fungos, parecendo constituir um solvente adequado para o uso em ensaios biológicos com fungos Outra sugestão para futuros trabalhos nesta área seria utilizar uma nova técnica de ensaio (utilizando inóculo líquido). Por fim, a utilização de outras concentrações de benzoquinonas pode também contribuir para um melhor leque de resultados em resposta à questão da influência de benzoquinonas no crescimento de fungos em farinha de milho.

3.7. AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BACTERICIDA DA 1,4-BENZOQUINONA

Para a bactéria *E. coli* o composto da benzoquinona dissolvida em água teve efeito nos 2º e 3º poços (concentrações mais elevadas), onde não se verificou crescimento microbiano (**quadro 17**). Em relação à EBQ+MBQ dissolvida em etanol e à BQ dissolvida em metanol, até ao 4º poço não ocorreu crescimento microbiano. No ensaio controlo de solvente com o etanol obteve-se uma resposta semelhante, ou seja, não se verificou crescimento bacteriano até ao 4º poço. Assim, não é possível excluir o efeito do solvente na ausência de crescimento bacteriano no ensaio com benzoquinona. No entanto, o facto de não ter ocorrido crescimento bacteriano nas amostras em contacto com as benzoquinonas quando dissolvidas em água, para as concentrações mais elevadas, sugere que estas possam exercer algum efeito negativo na bactéria *E.coli*.

Quadro 17- Resumo dos resultados do ensaio de exposição de *Escherichia coli* a benzoquinonas e seus solventes: 1,4- benzoquinona dissolvida em metanol – BQ (M); metanol; 1,4-benzoquinona dissolvida em água - BQ (A); água; etil-1,4-benzoquinona e metil-1,4-benzoquinona em etanol; etanol. Os números das colunas representam os poços, sendo os números: 1 o controlo negativo sem bactérias, mas com benzoquinonas, 11 controlo positivo sem benzoquinonas e 12 o controlo negativo sem bactérias; dos números 2 ao 10 colocaram-se as benzoquinonas em diluições sucessivas de 1:2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BQ (M)		○	○	○	●	●	●	●	●	●		
Metanol		○	○	○	○	○	○	○	○	○		
BQ (A)		○	○	●	●	●	●	●	●	●		
Água		●	●	●	●	●	●	●	●	●		
EBQ+MBQ (E)		○	○	○	●	●	●	●	●	●		
Etanol		○	○	○	○	○	○	○	○	○		

● Com crescimento bacteriano ○ Sem crescimento bacteriano

Em relação aos ensaios efetuados com *L. monocytogenes*, observou-se que o efeito dos compostos benzoquinona dissolvida em água, benzoquinona dissolvida em metanol e EBQ+MBQ dissolvidas em etanol foi superior ao observado para *E. coli*, uma vez que não houve crescimento do 2º ao 5º poço (**quadro 18**). No entanto, verificou-se que tanto o controlo com etanol como o controlo com o metanol interferiram negativamente com o crescimento bacteriano. Assim, não podemos afirmar que a ausência de crescimento se deve ao efeito exclusivo das benzoquinonas dissolvidas tanto em metanol como em etanol. No entanto, o facto de não ter ocorrido crescimento bacteriano nas amostras em contacto com as benzoquinonas quando dissolvidas em água, para as concentrações mais elevadas, sugere que possam exercer algum efeito negativo para esta bactéria.

Quadro 18- Resumo dos resultados do ensaio de exposição de *Listeria monocytogenes* a benzoquinonas e seus solventes: 1,4- benzoquinona dissolvida em metanol - BQ(M); metanol; 1,4-benzoquinona dissolvida em água - BQ(A); água; etil-1,4-benzoquinona e metil-1,4-benzoquinona dissolvidas em etanol; etanol. Os números das colunas representam os poços, sendo os números: 1 o controlo negativo sem bactérias, mas com benzoquinonas, 11 o controlo positivo sem benzoquinonas e 12 o controlo negativo sem bactérias; dos números 2 ao 10 colocaram-se as benzoquinonas em diluições sucessivas de 1:2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
BQ (M)		○	○	○	○	●	●	●	●	●		
Metanol		○	○	○	○	○	○	○	○	○		
BQ (A)		○	○	○	○	●	●	●	●	●		
Água		●	●	●	●	●	●	●	●	●		
EBQ+MBQ (E)		○	○	○	○	●	●	●	●	●		
Etanol		○	○	○	○	○	○	○	○	○		

● Com crescimento bacteriano ○ Sem crescimento bacteriano

Segundo Yezerski *et al.* (2007), o *T. castaneum* é um produtor de uma mistura de quinonas que, além de agir como uma descarga nociva para repelir ameaças, exibe propriedades antimicrobianas contra bactérias e leveduras.

Lana *et al.* (2006) testaram o efeito antibacteriano de treze derivados da 1,4-benzoquinona em duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*) e em duas bactérias Gram-negativas (*Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*) e demonstraram que a 1,4-benzoquinona foi ativa contra as quatro bactérias testadas. Contrariamente aos resultados obtidos nesse estudo, Kim (2010) demonstrou que a hidroquinona (HQ) (forma reduzida da BQ) tinha uma atividade antibacteriana significativamente mais baixa que a BQ, para *S. aureus* e *S. typhimurim*, o que contraria os nossos resultados no entanto, o facto de serem utilizadas espécies diferentes de bactérias pode explicar parte desta discrepância de resultados.

De futuro seria importante recolher dados quantitativos determinando as concentrações mínimas inibitórias (MICs), pois no presente trabalho tal não foi possível, e assim poderia obter-se um espectro de respostas maior. A concentração mínima inibitória (MICs) é a concentração mais baixa que um composto inibe o crescimento bacteriano (Andrews, 2001).

CAPÍTULO 4 – CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

A interação entre o inseto *T. castaneum*, produtor de benzoquinonas, e fungos produtores de micotoxinas, dos produtores armazenados, foi estudada nesta dissertação de mestrado através da avaliação do efeito da presença e dos metabolitos produzidos por *T. castaneum* na micobiota de farinha de milho e em bactérias.

A avaliação da micobiota dos grãos de milho e da farinha de milho, nas condições dos ensaios, resultou em quatro fungos identificados à espécie: *A. flavus*, *A.niger*, *F. oxysporum*, e *P. purpurogenum*. Os resultados da determinação das micotoxinas (aflatoxinas totais e ocratoxina A) deram negativos nos dois ensaios realizados, no entanto, estes resultados podem dever-se ao facto de estas estirpes e/ou espécies de fungos não produzirem micotoxinas naturalmente, ou não terem sido fornecidas as condições ideais para a sua produção.

Após a análise de todos os resultados estatísticos referentes ao efeito fungicida e fungistático das benzoquinonas libertadas pelo *T. castaneum*, conclui-se que existem indicações que estas substâncias podem interferir no crescimento dos fungos testados, apesar de ser notória a necessidade de aprofundar o estudo desta interação. Por outro lado, a 1,4-benzoquinona (BQ) diluída em água destilada esterilizada mostrou uma influência negativa no fungo *Trichoderma* sp.. Os resultados da avaliação do crescimento radial dos fungos indicam que as benzoquinonas têm uma influência nos fungos, especialmente nos fungo *Trichoderma* sp. e *F. oxysporum*, utilizando a água (SDW) como solvente. Os fungos *P. purpurogenum* e *F. oxysporum* quando expostos a EBQ+MBQ apresentaram um crescimento menor do que quando expostos ao solvente etanol. Os solventes utilizados, etanol e metanol, influenciaram os resultados, pois ambos demonstraram ter um efeito fungicida e fungistático sobre os fungos. Dado o carácter exploratório deste trabalho, deixam-se algumas sugestões para o desenvolvimento desta investigação no futuro, tais como: a concentração de benzoquinonas a ser testada deverá incluir diferentes valores, de modo a permitir comparação entre possíveis efeitos associados à quantidade de benzoquinonas em contacto com os fungos; seleção de solventes menos tóxicos para os fungos; e a utilização de outra metodologia alternativa de ensaio de avaliação do crescimento dos fungos como, por exemplo, a utilização de um inóculo líquido.

Em relação ao efeito bactericida, tal como para o efeito fungicida e fungistático, a 1,4-benzoquinona (BQ) diluída em água destilada esterilizada evidenciou um efeito negativo no crescimento das duas bactérias testadas: *E. coli* e *L. monocytogenes*. Futuramente, será importante quantificar as concentrações mínimas inibitórias (MICs), utilizando um leitor de placas.

Apesar do carácter exploratório deste trabalho, foi um passo importante no sentido de investigar e procurar respostas como o tipo de interação entre esta praga de insetos, em farinha de milho, e os fungos e bactérias. Este trabalho representa o primeiro estudo efetuado com benzoquinonas excretadas por *T. castaneum* e fungos que se desenvolvem na farinha de milho no sentido de investigar se existe algum tipo de interação, negativa ou positiva, entre ambos.

BIBLIOGRAFIA

- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Volume 48, pp. 5-16.
- American Association of Cereal Chemists (AACC) (1999). Moisture – Air - Oven Methods. International method, pp. 1-4.
- Ahmad, S. K., & Singh, P. L. (1991). Mycofloral changes and aflatoxin contamination in stored chickpea seeds. *Food Additives and Contaminants*, Volume 8, pp. 723–730.
- Allotey, J., Simpanya, M. F., & Mpuchane, S. (2001). Insect and mycoflora interactions in maize flour. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, Volume 8, pp. 3-8.
- Assunção, R. (2017). Children exposure to multiple mycotoxins through food consumption: a holistic approach for risk assessment. Tese de doutoramento em Ciências Veterinárias. Universidade de Évora, Évora.
- Alvito, P. (2014). Alterações do estado de saúde associada à alimentação. Contaminação química- Micotoxinas. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Departamento de Alimentação e Nutrição. Unidade de Investigação e Desenvolvimento. Ministério da Saúde.
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) (2019a). *Escherichia coli*. Disponível em <http://www.asae.gov.pt/>. Consultado em 23 de setembro de 2019.
- Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) (2019b). *Listeria monocytogenes*. Disponível em <http://www.asae.gov.pt/>. Consultado em 23 de setembro de 2019.
- Atanda S. A. (2011). Fungi and mycotoxins in stored foods. *African Journal of Microbiology Research*, Volume 5, pp. 4373–4382.
- Barros, G. (2007). Insectos e ácaros. Em R. Mancini, M. O. Carvalho, B. Timlick, & C. Adler (Eds.), *Contribuição para a proteção do arroz armazenado* (pp. 23–47). Lisboa: IICT - Instituto de Investigação Científica Tropical.
- Barros, J. F. C., & Calado, J. G. (sem data). A cultura do milho. Cedido pela Universidade de Évora, Escola de Ciências e Tecnologia, Departamento de Fitotecnia.
- Beachler, R. (2003). Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Council for Agricultural Science and Technology. Iowa, USA.
- Benbrook, C. (2005). Breaking the mold: impacts of organic and conventional farming systems on mycotoxins in food and livestock feed. *The Organic Center*, Volume 3, pp. 1–6.
- Carvalho, M. O., Cambeiro, A., Fradinho, P., Magro, A., Teixeira, B., Mendes, R., & Mourato, M. P. (2018). Stored Grain Protection: cases studies in Portugal. 12th International Working Conference on Stored Product Protection, Berlin, Germany.
- Carvalho, M. O., Fradinho, P., Martins, M. J., Magro, A., Raymundo, A., & de Sousa, I. (2019). Paddy rice stored under hermetic conditions: The effect of relative humidity, temperature and storage time in suppressing *Sitophilus zeamais* and impact on rice quality. *Journal of Stored Products Research*, Volume 80, pp. 21–27.
- Chohan, S., Atiq, R., Mehmood, M. A., Naz, S., & Siddique, B. (2011). Efficacy of few plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. gladioli, the cause of corm rot of gladiolus. *Journal of Medicinal Plants Research*, Volume 5, pp. 3887–3890.

- Clark, H. A., & Snedeker, S. M. (2006). Ochratoxin A: Its cancer risk and potential for exposure. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, Volume 9*, pp. 265–296.
- Clerk, G. C., & Badu-Yeboah, K. (1996). A possible mode of dispersal of contaminant fungi of maize grains by *Sitophilus zeamais* Linn and *Tribolium castaneum*.
- D'Mello, J. P. F. (Ed.). (2003). Food safety: contaminants and toxins. Wallingford: CABI.
- Da Silva Belchol, F., Ribeiro do Valle Teixeira, I., & Freire de Bastos, F. (2017). Preferência alimentar do *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) em farinha de soja integral. *Revista Acadêmica: Ciência Animal, Volume 5*, pp. 57.
- Dao, T., & Dantigny, P. (2011). Control of food spoilage fungi by ethanol. *Food Control, Volume 22*, pp. 360–368.
- Devices, D. (2005). Temperature dependence of the water activity of saturated salt solutions. Disponível em www.decagon.com. Consultado em 28 de março de 2019.
- Eksteen, D., Pretorius, J. C., Nieuwoudt, T. D., & Zietsman, P. C. (2001). Mycelial growth inhibition of plant pathogenic fungi by extracts of South African plant species. *Annals of Applied Biology, Volume 139*, pp. 243–249.
- El-Desouky, T. A., Elbadawy, S. S., Hussain, H. B. H., & Hassan, N. A. (2018). Impact of insect densities *Tribolium castaneum* on the benzoquinone secretions and aflatoxins levels in wheat flour during storage periods. *The Open Biotechnology Journal, Volume 12*, pp. 104–111.
- Eloff, J. N., Masoko, P., & Picard, J. (2007). Resistance of animal fungal pathogens to solvents used in bioassays. *South African Journal of Botany, Volume 73*, pp. 667–669.
- European Commission (2006). Commission Regulation (EC) No 401/2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. *Jornal Oficial da União Europeia, Volume 70*, pp. 12–34.
- Fan, Y., Huarte-Bonnet, C., Ortiz-Urquiza, A., Pedrini, N., Juárez, M. P., & Keyhani, N. O. (2015). Tenebrionid secretions and a fungal benzoquinone oxidoreductase form competing components of an arms race between a host and pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Volume 112*, pp. 3651–3660.
- FAO. (1992). Maize in human nutrition. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Faroni, L. (1998). Fatores que influenciam a qualidade dos grãos armazenados. Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa.
- Fleurat-Lessard, F. (2017). Integrated management of the risks of stored grain spoilage by seedborne fungi and contamination by storage mould mycotoxins – An update. *Journal of Stored Products Research, Volume 71*, pp. 22–40.
- Frisvad, J. C., Thrane, U., Samson, R. A., & Pitt, J. I. (2006). Important mycotoxins and the fungi which produce them. In: Hocking A. D., Pitt J. I., Samson R. A., Thrane U. (eds). *Advances in Food Mycology. Advances in Experimental Medicine and Biology, Volume 571*. Springer, Boston, MA.
- Haines, C. P. (1991). Insects and arachnids of tropical stored products: their biology and identification. Natural Resources Institute (NRI), United Kingdom, pp. 246.
- Heredia, N., Wesley, I., & García, S. (Eds.). (2009). Microbiologically Safe Foods. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

- Ho, V. A., Le, P. T., Nguyen, T. P., Nguyen, C. K., Nguyen, V. T., & Tran, N. Q. (2015). Silver core-shell nanoclusters exhibiting strong growth inhibition of plant-pathogenic fungi. *Journal of Nanomaterials*, Volume 2015, pp. 7.
- Hocking, A. D. (2003). Microbiological facts and fictions in grain storage. *Proceedings of the Australian Post-Harvest Technical Conference*, pp. 55–58.
- ICMSF. (2005). *Microorganisms in Food 6: Microbial Ecology of Food Commodities*. (I. C. on M. S. fo Foods, Ed.) (segunda ed). Nova Iorque: An Aspen Publication.
- Kim, M. H. (2010). Antimicrobial activities of 1,4-benzoquinones and wheat germ extract. *Journal of microbiology and biotechnology*, Volume 20, pp. 1204–1209.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R., Nehls, I., 2010. Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. *Microbiol. Biotechnol*, Volume 86, pp. 1595–1612.
- Krska R., Schubert-Ullrich P., Molinela A., Sulyok., MacDonald S. & Crews C. (2008). Mycotoxins analysis: an update. *Food additives and contaminants*, Volume 25, pp. 152-163.
- Kumari, P., Sivadasan, R., & Jose, A. (2011). Microflora associated with the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Agricultural Technology*, Volume 7, pp. 1625–1631.
- Lana, E. J. L., Carazza, F., & Takahashi, J. A. (2006). Antibacterial evaluation of 1,4-benzoquinone derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Volume 54, pp. 2053–2056.
- Lis, B., Bakula, T., Baranowski, M., & Czarnewicz, A. (2011). The carcinogenic effects of benzoquinones produced by the flour beetle. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, Volume 14, pp. 159–164.
- Machekano, H., & M. Mvumi, B. (2018). Insect infestation sources in stored maize grain; what is more important resident versus incoming infestation? 12th International Working Conference on Stored Product Protection, Berlin, Germany.
- Magan, N., Aldred, D., Mylona, K., & Lambert, R. J. (2010). Limiting mycotoxins in stored wheat. *Additives & Contaminants: Part A*, Volume 27, pp. 644-650.
- Magro, A. (2009). Avaliação das actividades fungistática e fungicida de extractos de plantas e seus constituintes em produtos agrícolas secos armazenados. Tese de Doutoramento em Biologia. Universidade de Lisboa, Lisboa.
- Magro, A., Carolino, M., Bastos, M., & Mexia, A. (2006). Efficacy of plant extracts against stored products fungi. *Revista Iberoamericana de Micologia*, Volume 23, pp. 176 –178.
- Martins, Carla & Assunção, Ricardo & Cunha, Sara & Fernandes, Jose & Jager, Alessandra & Petta, Tânia & Oliveira, Carlos & Alvito, Paula. (2017). Assessment of multiple mycotoxins in breakfast cereals available in the Portuguese market. *Food Chemistry*, pp. 239.
- Manaia, C. (2006). *Micróbios, pequenos seres com poderes gigantes*. Lisboa: Universidade Católica Editora.
- Mannaa, M. & Kim K. D. (2017). Influence of temperature and water activity on deleterious fungi and mycotoxin production during grain storage. *Mycobiology*, Volume 45, pp. 240-254.
- Mastronicolis, S. K., Boura, A., Karaliota, A., Magiatis, P., Arvanitis, N., Litos, C., Heropoulos, G. (2006). Effect of cold temperature on the composition of different lipid classes of the foodborne pathogen

- Listeria monocytogenes*: Focus on neutral lipids. Food Microbiology, Volume 23, pp. 184–194.
- McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J., & Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: A review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. International Journal of Food Microbiology, Volume 92, pp. 15–33.
- Medina-Córdova, N., López-Aguilar, R., Ascencio, F., Castellanos, T., Campa-Córdova, A. I., & Angulo, C. (2016). Biocontrol activity of the marine yeast *Debaryomyces hansenii* against phytopathogenic fungi and its ability to inhibit mycotoxins production in maize grain (*Zea mays* L.). Biological Control, Volume 97, pp. 70–79.
- Milani, J. M. (2013). Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: A review. Veterinary Medicina, Volume 58, pp. 405–411.
- Mohapatra, D., Kumar, S., Kotwaliwale, N., & Singh, K. K. (2017). Critical factors responsible for fungi growth in stored food grains and non-Chemical approaches for their control. Industrial Crops and Products, Volume 108, pp. 162–182.
- Morales-Quintana, L., Faúndez, C., Herrera, R., Zavaleta, V., Ravanal, M. C., Eyzaguirre, J., & Moya-León, M. A. (2017). Biochemical and structural characterization of *Penicillium purpurogenum* α -D galactosidase: Binding of galactose to an alternative pocket may explain enzyme inhibition. Carbohydrate Research, Volume 448, pp. 57–66.
- Neme, K., & Mohammed, A. (2017). Mycotoxin occurrence in grains and the role of postharvest management as a mitigation strategies. A review. Food Control, Volume 78, pp. 412–425.
- Nesci, A., Barra, P., & Etcheverry, M. (2011). Integrated management of insect vectors of *Aspergillus flavus* in stored maize, using synthetic antioxidants and natural phytochemicals. Journal of Stored Products Research, Volume 47, pp. 231–237.
- OECD-FAO. (2018). Chapter 3. Cereals agricultural outlook 2018-2027. OCED/FAO, pp. 109–126.
- PACA. (2012). Aflatoxin impacts and potential solutions in agriculture, trade, and health. An introduction to aflatoxin impacts in África. Partnership for Aflatoxin Control in Africa (PACA). The United Nations.
- Paim, L., Barros, G., Magro, A., Borges da Silva, E., Mexia, A., & Lima, A. (2018). Insects and fungi in stored maize in Angola. 12th International Working Conference on Stored Product Protection, Berlin, Germany.
- Pappas, P. W., & Wardrop, S. M. (1996). Quantification of benzoquinones in the flour beetles, *Tribolium castaneum* and *Tribolium confusum*. Preparative Biochemistry and Biotechnology, Volume 26, pp. 53–66.
- Pedrini, N., Ortiz-Urquiza, A., Huarte-Bonnet, C., Fan, Y., Juárez, M. P., & Keyhani, N. O. (2015). Tenebrionid secretions and a fungal benzoquinone oxidoreductase form competing components of an arms race between a host and pathogen. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Volume 112, pp. 3651–3660.
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage*. (third ed.) New York: Springer.
- Poonyth, A. D., Hyde, K. D., & Peerally, A. (2001). Colonisation of *Bruguiera gymnorhiza* and *Rhizophora mucronata* wood by marine Fungi. Botanica Marina, Volume 44, pp. 75-80.
- Regulamento nº1881/2006 da Comissão de 19 de Dezembro de 2006. Jornal Oficial da União Europeia,

2006, L 364/5-L 364/24.

- Richard, J. L. (2007). Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 119, pp. 3-10.
- Rodrigues, P., Venâncio, A., Kozakiewicz, Z., & Lima, N. (2009). A polyphasic approach to the identification of aflatoxigenic and non-aflatoxigenic strains of *Aspergillus* Section *Flavi* isolated from Portuguese almonds. *International Journal of Food Microbiology*, Volume 129, pp. 187-193.
- Roger, R. W. (1970). *A mycological colour chart*. London: Commonwealth Mycological Institute.
- Samson, R. A. (2015). *Food & indoor fungi*. Netherland: CBS- Knav Fungal Biodiversity Centre.
- Santos, M. I. S., Lima, A. I., Monteiro, S. A. V. S., Ferreira, R. M. S. B., Pedroso, L., Sousa, I., & Ferreira, M. A. S. S. (2016). Preliminary study on the effect of fermented cheese whey on *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Salmonella* goldcoast populations inoculated onto fresh organic lettuce. *Foodborne Pathogens and Disease*, Volume 13, pp. 423–427.
- Shimada, A. L. B. (2011). Efeitos da exposição *in vivo* à hidroquinona sobre funções do tecido traqueal e de macrófagos alveolares de camundongos. Dissertação de Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas. Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Shukla, R., Kumar, A., Prasad, C. S., Srivastava, B., & Dubey, N. K. (2008). Antimycotic and antiaflatoxigenic potency of *Adenocalymma alliaceum* Miers. on fungi causing biodeterioration of food commodities and raw herbal drugs. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Volume 62, pp. 348–351.
- Soares, C., Abrunhosa, L., & Venâncio, A. (2013). Fungos produtores de micotoxinas: impacto na segurança alimentar. Sociedade Portuguesa de Microbiologia. Braga.
- Sreeramoju, P., Prasad, M. S. & Lakshmipathi, V. (2016). Complete study of life cycle of *Tribolium castaneum* and its weight variations in the developing stages. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, Volume 6, pp. 95–101.
- Taruvunga, C., Mejia, D., & Alvarez, S. (2014). Sistemas apropriados de armazenamento de sementes e cereais para pequenos agricultores. FAO.
- Tribolium Genome Sequencing Consortium, 2008. The genome of the model beetle and pest *Tribolium castaneum*. *Nature*, Volume 452, pp. 949–955.
- Tsehay, H., Brurberg, M. B., Sundheim, L., Assefa, D., Tronsmo, A., & Tronsmo, A. M. (2017). Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisin on maize grains in Ethiopia. *European Journal of Plant Pathology*, Volume 147, pp. 141–155.
- Unruh, L. M., Xu, R., & Kramer, K. J. (1998). Benzoquinone levels as a function of age and gender of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Volume 28, pp. 969–977.
- Valderrama, J. A., Colonelli, P., Vásquez, D., González, M. F., Rodríguez, J. A., & Theoduloz, C. (2008). Studies on quinones. Part 44: Novel angucyclinone N-heterocyclic analogues endowed with antitumoral activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Volume 16, pp. 10172–10181.
- Villers, P. (2017). Food safety and aflatoxin control. *Journal of Food Research*, Volume 6, pp. 38.
- Kirleis, A., & Stroshine, R. (1990). Effects of hardness and drying air temperature on breakage susceptibility and dry-milling characteristics of yellow dent corn. *Cereal Chemistry*, pp. 67.

- WHO-IARC. (1994). IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, Vol. 56, Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *Analytica Chimica Acta*, Volume 294, pp. 341.
- WHO-IARC. (1999). International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to Humans, Volume 74, pp. 1-427.
- Yezeriski, A., Ciccone, C., Rozitski, J., & Volingavage, B. (2007). The effects of a naturally produced benzoquinone on microbes common to flour. *Journal of Chemical Ecology*, Volume 33, pp. 1217–1225.

ANEXOS

Anexo 1- Temperature Dependence of the Water Activity of Saturated Salt Solutions (Fonte: DEVICES, 2005)

)

°C	Water Activity						
	Cesium Fluoride	Lithium Bromide	Zinc Bromide	Potassium Hydroxide	Sodium Hydroxide	Lithium Chloride	Calcium Bromide
10	0.049 ± 0.016	0.071 ± 0.007	0.085 ± 0.007	0.123 ± 0.014	--	0.113 ± 0.004	0.216 ± 0.005
15	0.043 ± 0.014	0.069 ± 0.006	0.082 ± 0.006	0.107 ± 0.011	0.096 ± 0.028	0.113 ± 0.004	0.202 ± 0.005
20	0.038 ± 0.011	0.066 ± 0.006	0.079 ± 0.005	0.093 ± 0.009	0.089 ± 0.024	0.113 ± 0.003	0.185 ± 0.005
25	0.034 ± 0.009	0.064 ± 0.005	0.078 ± 0.004	0.082 ± 0.007	0.082 ± 0.021	0.113 ± 0.003	0.165 ± 0.002
30	0.030 ± 0.008	0.062 ± 0.005	0.076 ± 0.003	0.074 ± 0.006	0.076 ± 0.017	0.113 ± 0.002	--
35	0.027 ± 0.006	0.060 ± 0.004	0.075 ± 0.003	0.067 ± 0.004	0.069 ± 0.015	0.113 ± 0.002	--
40	0.024 ± 0.005	0.058 ± 0.004	0.075 ± 0.002	0.063 ± 0.004	0.063 ± 0.012	0.112 ± 0.002	--
	Lithium Iodide	Potassium Acetate	Potassium Fluoride	Magnesium Chloride	Sodium Iodide	Potassium Carbonate	Magnesium Nitrate
10	0.206 ± 0.003	0.234 ± 0.005	--	0.335 ± 0.002	0.418 ± 0.008	0.431 ± 0.004	0.574 ± 0.003
15	0.196 ± 0.002	0.234 ± 0.003	--	0.333 ± 0.002	0.409 ± 0.007	0.432 ± 0.003	0.559 ± 0.003
20	0.186 ± 0.002	0.231 ± 0.003	--	0.331 ± 0.002	0.397 ± 0.006	0.432 ± 0.003	0.544 ± 0.002
25	0.176 ± 0.001	0.225 ± 0.003	0.308 ± 0.013	0.328 ± 0.002	0.382 ± 0.005	0.432 ± 0.004	0.529 ± 0.002
30	0.166 ± 0.001	0.216 ± 0.005	0.273 ± 0.011	0.324 ± 0.001	0.362 ± 0.004	0.432 ± 0.005	0.514 ± 0.002
35	0.156 ± 0.001	--	0.246 ± 0.009	0.321 ± 0.001	0.347 ± 0.004	--	0.499 ± 0.003
40	0.146 ± 0.001	--	0.227 ± 0.008	0.316 ± 0.001	0.329 ± 0.004	--	0.484 ± 0.004
	Sodium Bromide	Cobalt Chloride	Potassium Iodide	Strontium Chloride	Sodium Nitrate	Sodium Chloride	Ammonium Chloride
10	0.622 ± 0.006	--	0.721 ± 0.003	0.757 ± 0.001	0.775 ± 0.005	0.757 ± 0.002	0.806 ± 0.010
15	0.607 ± 0.005	--	0.710 ± 0.003	0.741 ± 0.001	0.765 ± 0.004	0.756 ± 0.002	0.799 ± 0.006
20	0.591 ± 0.004	--	0.699 ± 0.003	0.725 ± 0.001	0.754 ± 0.004	0.755 ± 0.001	0.792 ± 0.004
25	0.576 ± 0.004	0.649 ± 0.035	0.689 ± 0.002	0.709 ± 0.001	0.743 ± 0.003	0.753 ± 0.001	0.786 ± 0.004
30	0.560 ± 0.004	0.618 ± 0.028	0.679 ± 0.002	0.691 ± 0.001	0.731 ± 0.003	0.751 ± 0.001	0.779 ± 0.006
35	0.546 ± 0.004	0.586 ± 0.022	0.670 ± 0.002	--	0.721 ± 0.003	0.749 ± 0.001	--
40	0.532 ± 0.004	0.555 ± 0.018	0.661 ± 0.002	--	0.710 ± 0.003	0.747 ± 0.001	--
	Potassium Bromide	Ammonium Sulfate	Potassium Chloride	Strontium Nitrate	Potassium Nitrate	Potassium Sulfate	Potassium Chromate
10	0.838 ± 0.002	0.821 ± 0.005	0.868 ± 0.004	0.906 ± 0.004	0.960 ± 0.014	0.982 ± 0.008	--
15	0.826 ± 0.002	0.817 ± 0.004	0.859 ± 0.003	0.887 ± 0.003	0.954 ± 0.010	0.979 ± 0.006	--
20	0.817 ± 0.002	0.813 ± 0.003	0.851 ± 0.003	0.869 ± 0.003	0.946 ± 0.007	0.976 ± 0.005	--
25	0.809 ± 0.002	0.810 ± 0.003	0.843 ± 0.003	0.851 ± 0.004	0.936 ± 0.006	0.973 ± 0.005	0.979 ± 0.005
30	0.803 ± 0.002	0.806 ± 0.003	0.836 ± 0.003	--	0.923 ± 0.006	0.970 ± 0.004	0.971 ± 0.004
35	0.798 ± 0.002	0.803 ± 0.004	0.830 ± 0.003	--	0.908 ± 0.008	0.967 ± 0.004	0.964 ± 0.004
40	0.794 ± 0.002	0.799 ± 0.005	0.823 ± 0.003	--	0.890 ± 0.012	0.964 ± 0.004	0.959 ± 0.004

